Lezione di Patologia generale e fisiopatologia clinica (sem2) del 25/2/2013 (1)

Lezioni di Patologia Generale e Fisiopatologia del 25/02/2013

Sbobinatore: Serena Ammendola

Revisore: Carlotta Gironda

Prof. Cassatella

MECCANISMI DI RICONOSCIMENTO DEL NON-SELF

(Tutte le slides fanno riferimento alla lezione del 25/02/13)

I **meccanismi di riconoscimento del non-self** coinvolgono il legame con strutture di agenti patogeni e sostanze dell'ospite che di norma l' immunità non "vede". I componenti del non-self sono riconosciuti da leucociti, macrofagi, neutrofili, cellule dendritiche e proteine plasmatiche, definite componente umorale dell'immunità innata, che agiscono durante le prime fasi della risposta dell'ospite.

Il riconoscimento degli agenti patogeni scatena una serie di **risposte rapide** tra cui la stimolazione delle cellule a produrre **citochine**, le quali innescano un effetto a cascata per rispondere all'infezione, e viene anche messa in atto la **preparazione della risposta specifica**. Le componenti cellulari dell'immunità innata rappresentano i primi meccanismi di difesa dell'ospite e possono direttamente eliminare i patogeni oppure, se non riescono ad eliminarli, stimolano l'immunità specifica per espletare questo compito.

In questa risposta sono interessate tutte le cellule dell'immunità innata (macrofagi,neutrofili, fagociti in genere,cellule dendritiche) che producono citochine pro-infiammatorie in risposta ad agenti patogeni, o che se stimolate inducono il rilascio di proteine o mediatori tossici per i patogeni e altre funzioni importanti, come la presentazione degli antigeni ai linfociti operata da cellule dendritiche in primis ma anche da cellule diverse in particolari situazioni.

Queste risposte sono fondamentali per l'induzione dell'immunità specifica, il reclutamento ulteriore di quella innata e quindi l'uccisione di agenti patogeni.

Il meccanismo di riconoscimento si basa su **recettori che individuano delle specifiche strutture o componenti dei patogeni che sono conosciute sotto il nome collettivo di PAMPs (Pathogen Associated Molecular Patterns)**, con le quali il sistema immunitario attraverso l'immunità adattativa esprime recettori codificati già a livello della linea germinale. **Molto spesso sono strutture essenziali per la vita dei patogeni** (per es. gli acidi nucleici: DNA e RNA SS o DS, quest'ultimo tipico dei virus; regioni di DNA non metilate ricche di domini CpG che non sono presenti nell'ospite; proteine tipicamente batteriche come per esempio la flagellino e la pilina; l'LPS e l'acido lipoteicoico di Gram positivi e negativi; alcuni zuccheri: catene di mannano e quelle di glucano, componenti della parete dei funghi).

Le cellule dell'ospite esprimono **recettori**,detti **PRR (Pattern Recognition Receptors**) **che riconoscono** e legano i PAMPs **e anche strutture dell'ospite che non sono normalmente presenti nell'ambiente** ma che compaiono per esempio in caso di necrosi o in altre situazioni gravi (chiamate **allarmine o DAMPs- damage associated molecular patterns)**. Queste strutture sono invarianti, <u>non</u> possono essere <u>mutate</u> proprio perché essenziali alla sopravvivenza del microorganismo, al contrario degli antigeni riconosciuti dall'immunità adattativa che mutano costantemente per eludere le difese dell'organismo.

I PRR sono espressi costitutivamente nelle cellule dell'ospite, sono presenti nella linea germinale, non sono clonali e sono indipendenti dalla memoria immunologica e dalla fase del ciclo vitale del patogeno contro cui sono diretti. Sono quindi recettori specifici per componenti immutate dei microorganismi, in analogia con i linfociti B e T, che invece hanno recettori molto più specifici contro epitopi che cambiano continuamente; a differenza dei PRR questi ultimi devono essere prima indotti. Quindi già a livello dell'immunita innata esiste una specializzazione contro i microbi. I PRRs riconoscono PAMPs specifici, mostrano pattern d'espressione distinti, che attivano specifici pattern di segnale e portano a meccanismi di difesa che possono essere differenti. Non è che ogni cellula esprime tutti i PAMPs (forse intendeva PRR NdR), esiste in generale una specializzazione: alcuni sono espressi maggiormente in certi tipi di cellule rispetto ad altri, i segnali possono essere diversi in funzione della cellula che esprime quei determinati PAMPs (anche qui credo intendesse PRR NdR), le risposte attivate dai PAMPs possono essere cellulo-specifiche.

I PRR si suddividono in categorie a seconda della loro localizzazione:

- solubili (e quindi secreti nell'ambiente extracellulare);
- di membrana;
- intracellulari(sia nel citoplasma sia in altri compartimenti cellulari);

tale dislocazione favorisce l'instaurarsi di una risposta immunitaria a seconda del tipo del patogeno, del metabolismo dei patogeni e ai meccanismi utilizzati per infettare l'organismo.

Esempi di sensori (recettori) dell'immunità innata: (*slide 5 e 7)*

- **rilasciati nell'ambiente:**

- la mannose binding lectin protein (<u>MBL</u>), che lega mannosio;

-altre proteine che appartengono alla famiglia delle pentrassine, proteine extracellulari che riconoscono alcuni PAMPs batterici e funzionano da sole come recettori o possono fungere da opsonine.

- PRR solubili prodotti soprattutto dal **fegato** e da alcuni **leucociti**: tra questi è importante la famiglia delle <u>Pentrassine</u> che a loro volta sono divise in corte o lunghe: sono proteine pentameriche e includono varie proteine della fase acuta come la proteina C reattiva (CRP) e altre pentrassine (la più studiata è la 3). Pentrassine: riconoscono fosforilcolina e fosfatidiletanolammina presenti nei microbiche (soprattutto funghi).(*slide 9*). Altre famiglie: le<u>ficoline</u>**,** <u>collettine</u>, alcuni <u>componenti del complemento</u>e poi altre molecole assimilabili a queste classi per struttura.

- **PRR della membrana:**

- Toll-like receptors (TLR) in grado di legare componenti batteriche, virali e fungine;

- il gruppo delle dectine, che riconoscono strutture dei funghi in particolare.

- i CLR (C-type like receptors) che riconoscono componenti fungine.

- gli Scavenger receptors che riconoscono PAMPs e varie altre strutture; possono mediare la fagocitosi.

- **PRR intracellulari:**

- TLR che si attivano quando i microorganismi sono inglobati negli endosomi e sono in grado di riconoscere acidi nucleici microbici.

- **PRR citoplasmatici:**

la famiglia dei NOD-like receptors (NLR) suddivisa in varie sottofamiglie che riconoscono soprattutto pattern microbici intracellulari che infettano la cellula e hanno localizzazione citoplasmatica.

- Altri recettori ancora riconoscono **DNA e RNA** e sono famiglie tipo la RIG-I-like receptors che riconosce particolarmente l'RNA virale e microbico (in generale DS). Ci sono anche altre proteine studiate di recente che vengono continuamente riclassificate.

Il concetto fondamentale è che le proteine solubili in grado di riconoscere PAMPs e i **PRR rappresentano la parte umorale dell'immunità innata**, in parallelo con la componente umorale dell'immunità specifica, rappresentata dagli anticorpi.

Meccanismi di difesa contro i microorganismi si dividono quindi in una immunità innata/naturale/aspecifica (rapida, costituita da una serie di meccanismi che sono preesistenti, mediata da fagociti che riconoscono microorganismi grazie a un limitato numero di pattern recognition receptors (PRR)), e una specifica/adattativa (data dai linfociti T e B che hanno recettori altamente specifici per un singolo antigene).

Differenze tra le due immunità (*slide 11)*

	INNATA	**ADATTATIVA**
Specificità	Sono sempre gli stessi recettori (PRR) su vari tipi cellulari; ciascun PRR può riconoscere svariati PAMPs di diversa natura	Anticorpi sono specifici per un solo Ag; ci possono essere più anticorpi diversi diretti verso lo stesso Ag
Recettori	Sono presenti già nella linea germinale; quantitativamente limitati	Cambiano continuamente per adattarsi sempre meglio ad antigene

Distribuzione recettori	Tipi cellulari deputati sono molteplici, ampia distribuzione	Solo linfociti B e T
Riconoscimento self/non-self	Cellule sane non riconosciute	Cellule sane non riconosciute
Memoria immunologica (differenza chiave)	NO	SI'. In caso di una seconda esposizione allo stesso antigene viene reclutata subito l'immunità specifica.

(*slide 12)*

Risposta tipo di un fagocita "x" che esprime PRR: fagocita con PRR di membrana con funzione di legare particelle opsonizzanti e poi mediano fagocitosi e il riconoscimento intracellulare del microorganismo da parte di una proteina della famiglia delle NLR. Altra funzione importante è la capacità dei recettori che hanno legato il patogeno di scatenare una risposta infiammatoria, con produzione di citochine e mediatori facenti parte di un programma genico orientato contro l' antigene così da mettere in atto il programma migliore per l'eliminazione di patogeni.

TOLL-LIKE RECEPTORS

Sono localizzati sulla membrana. Ne sono stati scoperti 13 nel topo e **10 nell'uomo**, il numero cambia a seconda della specie (nel riccio di mare ce ne sono 150). Sono sistemi di riconoscimento molto conservati durante l' evoluzione.

Ligandi classici dei TLR (*slide 13)*

TLR2 - lega i lipopeptidi, soprattutto dei Gram negativi (diacilati e triacilati), eterodimerizza con **TLR6** o **TLR1** assumendo elevata specificità per questi ligandi.

TLR3 - lega DS-RNA (anche un componente sintetico che mima l'RNA)

TLR4 - riconosce LPS dei Gram negativi (ma anche taxolo (piante), Heat Shock Proteins (HSP))

TLR5 - lega flagellina

TLR7 e 8 - sempre insieme in eterodimeri, riconoscono SS-RNA (8 pare non esista nel topo)

TLR9 - lega porzioni modificate di DNA (isole CpG)

TLR10 - unknown

TLR11 – lega alcuni componenti di batteri che causano infezioni urinarie e la profilin-like protein espressa da *Toxoplasma gondii*

Ma ciascuno può legare molti altri ligandi. (*slide 14-15-16*)

Anche componenti cellulari dell'ospite possono essere riconosciuti se rilasciate nell'ambiente da una cellula danneggiata.

Ps: un patogeno può esprimere più tipi di PAMPs che quindi verrà riconosciuto da una serie di TLR.

Esiste un'espressione differenziale da parte dei leucociti dei vari TLR in conseguenza delle azioni specifiche dei vari leucociti.

Come mai dei singoli TLR sono in grado di riconoscere non un unico PAMP ma diversi?

Pare che esistano delle **molecole accessorie** che possono essere cellula-specifiche e che si possono associare ai vari TLR per aumentare la specificità verso un singolo componente. Ne sono state scoperte molte. (Esempio: TLR4 si avvale di varie molecole accessorie come MD2, CD14 etc…) (*slide 20)*

La struttura dei TLR di membrana e quelli endosomiali è molto simile e conservata e presentano:

- un **dominio extracellulare** con una sequenza ripetuta ricca di leucine (leucine rich domain); la composizione amminoacidica di questo dominio conferisce la specificità per il riconoscimento delle molecole;
- un **dominio transmebranario**;
- un **dominio intracitoplasmatico**, detto **TIR domain**, molto simile al dominio intracitoplasmatico di uno dei recettori per IL-1, importantissimo per l'instaurarsi dell'infiammazione e infatti media risposte cellulari molto simili a quello dell'interleuchina.

Il dominio TIR si trova **anche in** alcuni recettori espressi in **Drosophila**, chiamati Toll, in grado di influenzare lo sviluppo embrionale del moscerino. Visto che il TIR domain è presente in altre specie in relazione alla risposta immunitaria con modalità un po' diverse, si è capito che questi recettori devono avere anche una loro importanza nella difesa del moscerino contro gli agenti patogeni. Lo stesso dominio viene espresso anche dalle piante. Fondamentali per la risposta dell'immunità innata anche le leucine repeats, che sono molto simili in organismi minori.

I TLR sono fondamentali in quanto il loro riconoscimento dei PAMPs attiva una serie di risposte fondamentali per scatenare la risposta infiammatoria (meccanismi dell'immunità innata) per eliminare i microorganismi e contemporaneamente i mediatori attivati attraverso i TLR contribuiscono allo sviluppo dell'immunità acquisita, attraverso una serie di segnali intracellulari che portano alla produzione di citochine, chemochine e molecole costimolatorie, fondamentali per attivare le risposte infiammatorie e i meccanismi di difesa, ma soprattutto per creare l'ambiente adatto ad indurre la risposta specifica migliore per quell'organismo.

(*slide 28)*

Un **linfocita naive** che dopo presentazione dell'antigene prolifera e si attiva, poi **deve decidere di polarizzarsi per esempio in Th1 o 2** : questa **decisione è influenzata dai TLR (PRR)** perché l'agente patogeno verrà processato e modificato per la presentazione e nello stesso tempo, via TLR, andrà a indurre ed influenzare la produzione di citochine che creano **un ambiente che favorisce un certo tipo di polarizzazione.** Viene anche indotta la espressione di molecole costimolatorie per essere sicuri che l'attivazione dei linfocita T naive avvenga in maniera appropriata. **I geni attivati dalla cascata dei TLR sono specifici e dipendono dal tipo di patogeno** e contribuiscono a creare polarizzazione per ottenere le cellule migliori per l'eliminazione del patogeno. Sono passaggi chiave. TLR sono fondamentali per lo sviluppo iniziale di una risposta specifica.

(*slide 29)*

Al centro si vede una cellula dendritica che presenta l’antigene (può essere una APC o altri tipi) che stimolata da varie condizioni (es. agenti patogeni, cell. tumorali, cell. Apopototiche etc.) ed interagendo con altre cellule presenti (es. mastociti), diventa in grado di determinare la polarizzazione dei vari tipi di linfociti T helper modificando l'ambiente. Ciascuno di questi linfociti T polarizzati si specializza a produrre quelle citochine adatte per formare quella risposta infiammatoria adatta a quel patogeno.

Meccanismi che modificano l’espressione genica:

(slide 30- sapere bene)

Akira ha dato un contributo molto grosso per la comprensione di questi meccanismi.

Signalling dei TLR (di membrana ed endosomiali): questi recettori si avvalgono di proteine adattatrici intracellulari che si legano al TIR domain. Sono abbastanza aspecifiche e reclutano altre proteine a formare i **signalosomi** che vanno ad attivare le protein chinasi.

Le chinasi attivate in vari modi attivano fattori di trascrizione citoplasmatica con meccanismi di fosforilazione. Sono quindi responsabili della modulazione dell’espressione genica.

NB: TNF e IL-1 sono cruciali per innescare la risposta infiammatoria.

TLR stimolano anche produzione di chemochine (CCL8,CCL2, CCL5, RANTES), un pattern di chemochine in genere.

Stimolano anche trascrizione di geni per molecole di adesione per le varie fasi di trasmigrazione dei leucociti e molecole antivirali come IFN gamma

Esempio: **TLR4 signalling >** recettore specifico per LPS della parete dei batteri Gram negativi. Il lipide A è la struttura fondamentale dell’LPS in grado di attivare l’immunità innata. **LPS** è il principale responsabile dello **shock settico (sepsi**) da infezione di Gram negativi persistente, riconosciuta non solo da leucociti ma anche da altre cellule, e tale fenomeno comporta l’attivazione della produzione massiva di citochine pro-infiammatorie. Un'attivazione acuta a livello sistemico porta febbre, alterazione della coagulazione, vasodilatazione e ipotensione grave. La sepsi è una drammatica risposta infiammatoria sistemica che il nostro organismo non riesce a riportare all’omeostasi. (*slide 33)*

(*slide 35-36)*

Quando l’LPS è legato a TLR4 genera una cascata di trasduzione del segnale consentita dall’azione di proteine adattatrici tra le quali soprattutto di **MyD88** che si lega a domino TIR di **tutti i TLR tranne il TLR-3**!!

Tutti questi recettori funzionano attraverso MyD88 che recluta varie componenti, portando infine all’attivazione di chinasi rappresentate dalla famiglia IRAK che attivate poi fosforilano vari substrati e soprattutto un’altra proteina adattatrice (TRAF6) che attiva una **cascata di trasduzione che porta infine all'attivazione del fattore di trascrizione NF-kB, importante per l’attivazione di molti geni pro-infiammatori.**

NF-kB nelle cellule è in forma inattiva (formato dalle subunità p50 e p65), legato ad un inibitore (IkB) che lo tiene sequestrato nel citosol. Quando arriva il segnale, IKKa si attiva e va a fosforilare IkB che si stacca così da NF-kB. Quando viene attivato, trasloca nel nucleo e stimola la trascrizione genica. Meccanismo molto conservato, lo trovo anche a livello di organismi inferiori con proteine ed enzimi molto simili.

(*slide 38)*

Il TLR 4 si avvale di altre proteine che attivano la trasduzione. Questo recettore lega LPS in quanto gli viene presentato da una proteina plasmatica che lega LPS (leucocyte binding protein, **LBP**) e che va ad interagire con la proteina CD14 (che è in grado di legare LPS), questa però non ha porzioni intracellulare e quindi non può trasdurre il segnale da sola. In seguito quindi si è capito che in realtà è il TLR 4 insieme alla proteina associata MD2,che permette in maniera effettiva la cascata trasduzionale.

In tutti i TLR che usano MyD88 come proteina adattatrice troviamo il Death domain (DD), dominio di interazione, che appunto permette interazioni con altre proteine o chinasi.(*il DD è la porzione nera del MyD88 NdR)*

Altra via di trasduzione attivate da Myd88: quella delle **MAPK** (p38-JNK- ERK) che alla fine vanno sempre a controllare i fattori di trascrizione. (*slide 39*)

(*slide 42-43)*

Nel caso di TLR 4 e 2 entra in gioco anche un'altra proteina adattatrice detta **TIRAP** (o **Mal**) e quindi la via prosegue con MyD88 che avvia un signalosoma coinvolgendo le MAP chinasi fino alla disinibizione di NF-kB che attiva geni come TNF, IL-6 e altri geni pro-infiammatori.

Questo **pathway scatenato da TLR4 con MyD88 è molto simile a quello innescato dal recettore dell'IL-1**, il quale innesca una cascata di trasduzione simile a quella stimolata LPS (via di trasduzione in comune data da TIR domain e dal reclutamento di MyD88).

I geni attivati dal TLR4 sono elencati alla *slide 44*.

(*slide 45)*

Akira (ricercatore che ha dato un enorme contributo alla ricerca sulla via di trasduzione dei TLR) ha creato un topo senza MyD88 e ha visto che poteva ancora rispondere all'LPS. Esso attiva ancora la via che porta ad attivazione di NF-kB ma l'attivazione inizia più tardi (sfasata). Si parla allora di **attivazione di NF-kB dipendente** e **indipendente da MyD88. (***slide 46)*

Hanno scoperto che LPS che arriva a TLR 4 subito attiva MyD88 e di conseguenza NF-kB, ma in maniera più sfasata induce la produzione di IFN beta che in maniera autocrina attiva una via di trasduzione propria e una serie di geni. Questa attivazione dell'IFN beta ha dimostrato quindi che **TLR4 riesce ad usare altre proteine adattatrici**, tra le quali in particolare **Trif**; si innesca quindi una via di trasduzione che porta alla fosforilazione e quindi all'attivazione di un altro fattore di trascrizione: **IRF3** ,che aumenta quindi la trascrizione del gene di IFNbeta.

In sintesi abbiamo quindi una via dipendente da MyD88 (produzione di citochine pro-infiammatorie) e una invece indipendente da MyD88 ma dipendente da Trif (attivazione ritardata di NF-kB e produzione di IFN beta).

(*slide 52)*

TLR3 lega Trif e quindi stimola la **produzione di IFN beta**.

Sappiamo che TLR3 è presente **solo sugli endosomi** e che riconosce il **ds-RNA**: la sua azione quindi si svolge nell' ambito di riconoscimento **dei virus**. Quindi come risposta immediata contro i virus vengono prodotti gli interferoni, le citochine antivirali per antonomasia.

La via Trif dipendente attivata da TLR4 avviene proprio perché TLR4 <u>migra sugli endosomi</u>! Il risultato finale sarà la produzione di IFN beta.

Domanda finale: come mai l'LPS che è un componente batterico induce interferone?

Lezione di Patologia generale e fisiopatologia clinica (sem2) del 26/2/2013 (1)

PATOLOGIA DEL 26/03/2013

Prof. Cassatella

Sbobinatore: Giorgia Be

Vie di segnalazione dei Toll-like receptor e di altri recettori per i patogeni

Le diapositive commentate in questa lezione si trovano nel file 260213a.

Vie di segnalazione di TLR4 e TLR3 (vie TRIF-dipendente e TRIF-indipendente)

In questa lezione parleremo dell'espressione e della produzione degli interferoni di tipo I che sono costituiti dagli interferoni alfa e beta. LPS attiva la produzione di IFN-beta attraverso un'altra via di trasduzione mediata dalla proteina adattatrice TRIF, importante in questa via di trasduzione. In questa via TRIF agisce con TLR4 in maniera sfasata rispetto all'attivazione della via di Myd88 in quanto TLR4 trasloca negli endosomi.

Da qualche tempo si cerca di comprendere qual è il meccanismo di traslocazione di TLR4 dalla membrana agli endosomi e si è scoperto che CD14 svolge un ruolo importante in questo meccanismo e che forse è il responsabile stesso di questa traslocazione, tramite un segnale di trasduzione mediato dalla tirosinchinasi SYK (o sirc? registrazione distrubata NdR) di cui avete già sentito parlare a proposito della fagocitosi .

Negli endosomi TLR4 lega TRIF tramite la proteina adattatrice TRAM. TRAM è una proteina adattatrice che si lega solo a TLR4 e non ad altri recettori.

Avremo quindi due diverse vie di trasduzione, una TRIF-dependent ed una MyD88-dependent, associate entrambe a TLR4. La via TRIF dependent parte dagli endosomi e si avvale di due proteine adattatrici, ossia TRAM e soprattutto TRIF.

TRIF a sua volta media una via di trasduzione che vedremo oggi che è utilizzata da molti recettori intracellulari e che si avvale della formazione di una serie di proteine di trasduzione che attivano alla fine della cascata due chinasi, TKB1 (TRAM binding kinase 1) e IKK-i o IKK- epsilon. Queste chinasi (in modo particolare TBK1 nel caso di TLR4) agiscono in sequenza e attivano e fosforilano IRF3. Questa via TRIF-TBK1-IRF-3 è cruciale per attivare la trascrizione dell'IFN-beta (partendo da TLR4). Inoltre questa via TRIF-dipendente, linearmente a quanto emerso da studi recenti su topi knockout, potenzia l'attivazione di NF-kB andando quindi ad amplificare anche la produzione di citochine proinfiammatorie.

L' IFN-beta una volta secreto dalle cellule andrà ad agire in modo paracrino sulle stesse cellule che l'hanno prodotto e su quelle vicine, e a sua volta attiva su queste cellule una serie di geni chiamati Interferon responsive genes, caratterizzati da un promotore in grado di attivare STAT-1 e altri fattori di trascrizione.

Più nel dettaglio, il programma genico attivato da TLR4, da parte per esempio di LPS, è caratterizzato dal punto di vista cinetico dall'attivazione di varie "ondate" di geni diversi, come illustrato nell'esempio sopra dell'interferone. (Oltre all'interferone anche TNF per esempio viene attivato in maniera molto potente da LPS; TNF viene secreto e lega recettori sulle cellule che l'hanno prodotto e attiva l'espressione di geni diversi). Questa serie di ondate di espressione di geni diversi dipendono dal fatto che sono prodotte citochine o proteine che hanno la capacità di attivare in sequenza geni diversi durante il tempo. E' molto importante capire la cinetica di queste fasi perché oggi ci sono i mezzi per intervenire e bloccare TLR4, gli interferoni, i recettori, TNF, ecc.

(fin qui ha risposto ad una domanda non registrata)

Slide 1

La via di trasduzione TRIF dipendente è attivata oltre che da TLR4 anche da TLR3.

TLR3 è l'unico toll-like receptor che non lega mai MyD88 e riconosce dsDNA di origine virale e proteine virali ed è implicato nella risposta contro i virus.TLR3 attiva gli interferoni di tipo primo, all'inizio soprattutto interferone beta, via TRIF-TBK 1-IRF3.

Perché TLR4 è tanto importante?

In primo luogo, TLR4 è in grado di legare oltre a LPS anche varie sostanze di origine virale, grazie alla presenza di cofattori che interagiscono con il recettore. Questi cofattori di cui abbiamo parlato la scorsa lezione, dipendono dalla cellula che li esprime e sono influenzati anche dal tipo di ligando. Ci sono due ragioni che spiegano l'importanza dell'attivazione della via TRIF dipendente. Un motivo è il fatto che da studi condotti su topi knockout è emerso che la produzione di IFN di tipo I, che è stimolata da tale via, è essenziale nella risposta verso LPS. Un'altra spiegazione è illustrata nella slide 2, ossia: la via TRIF-dipendente innescata da TLR4 attiva i geni che codificano per una parte delle molecole costimolatorie, espresse dalle cellule che presentano l'antigene e che sono fondamentali per la sinapsi immunologica e per l'induzione dell'attivazione appropriata dei linfociti T con conseguente polarizzazione. Ci sono altre spiegazioni, per esempio in alcune cellule questa via attivata da TLR4 media l'apoptosi, in altre no. Le funzioni di TLR4 sono ancora oggetto di studio.

Recettori di LPS (*Slide 3*)

La risposta di LPS, studiata ancora prima della scoperta di TLR4, risulta variabile a seconda della concentrazione di LPS stesso: a basse concentrazioni e in presenza di siero il principale recettore per LPS è TLR4, mentre in presenza di concentrazioni elevate di LPS, LPS può legare molte molecole presenti sulla membrana quali TLR2, CR3, CD11b, CD18, DAF, CD55 *(CR3, CD11b, CD18, DAF, CD55 sono tutte integrine)* e alcune heat shock proteins quali hsp70 e hsp90 che talvolta possono localizzarsi sulla membrana. A seconda del tipo di cellula si verranno a creare diverse piattaforme recettoriali, oltre al TLR4, che possono legare LPS e influenzare le risposte agendo da corecettori che si associano e inviano il loro segnale. Il recettore d'elezione di LPS rimane comunque TLR4.

TLR7, TLR8 e TLR9 (*Slide 4*)

Altri recettori presenti a livello degli endosomi oltre a TLR3 (che riconosce poly(I-C) dsRNA) sonoTLR7, TLR8 e TLR9; TLR7 e TLR8 sono funzionalmente equivalenti. In realtà questi toll-like receptors nella cellula resting sono nel reticolo endoplasmico e in seguito, all'arrivo del segnale, migrano nell'endosoma, il quale si fonde poi con il lisosoma. Altro oggetto di ricerca oggigiorno è appunto il meccanismo di traslocazione di questi recettori dai compartimenti intracellulari in cui si trovano agli endosomi. Alcune proteina come UNC93B1 fungono da trasportatori in questo processo; esistono delle patologie genetiche in cui manca questa proteina e in cui si hanno delle deficienze nelle risposte alle infezioni da virus.

TLR7 e TLR8 riconoscono ssRNA, mentre il TLR9 riconosce DNA proveniente da agenti microbici e batterici, il quale è caratterizzato da struttura con una conformazione e modificazioni assenti nell'ospite e questo permette quindi un riconoscimento specifico di questo DNA estraneo. Esistono quadri patologici autoimmuni in cui il TLR9 riconosce anche il DNA dell'ospite.

TLR7 e TLR8 funzionano alla stessa maniera, ma sono contraddistinti dalla loro espressione cellulare (**Slide 5)**: quasi tutti sono espressi sia nell'uomo che nel topo nei vari tipi di leucocoti con livelli di espressione più o meno elevati. TLR8 è espresso maggiormente nelle cellule mieloidi (monociti e granulociti neutrofili) mentre il TLR7 è espresso maggiormente da una sottopopolazione di cellule dendritiche del sangue rappresentata dalle cellule plasmacitoidi.

Come illustrato nella slide precedente (slide 4) questi recettori localizzati negli endosomi riconoscono acidi nucleici (DNA o RNA) soprattutto di origine virale ma anche batterica e inducono l'espressione di interferone di tipo I utilizzando MyD88 (diversamente da TLR3 e TLR4 che utilizzano TRIF per indurre interferoni di tipo I). Entrambi questi recettori attivano interferoni di tipo I e anche NF-kB. IRF-7 è il fattore di trascrizione inizialmente coinvolto per indurre la trascrizione degli interferoni di tipo I (nel caso di TLR-3 e TLR-4 il fattore di trascrizione per indurre gli interferoni di tipo I è invece IRF-3). IRF sta per "interferon responsive factor", ce ne sono vari sottotipi numerati fino a 9. Quindi TLR7 e TLR9 utilizzano la via di MyD88 e utilizzano NF-kB e IRF-7 come fattori di trascrizione.

La stimolazione di questi due recettori, TLR7 e TLR9, è fondamentale per la funzione di alcune cellule dendritiche, soprattutto delle cellule plasmacitoidi.

Cellule dendritiche (*Slide 6-7*)

In figura abbiamo una panoramica sulle cellule dendritiche di cui vi ricordo l'importanza: le cellule dendritiche sono APC e sono presenti nel sangue e da lì migrano nei tessuti, dove riconoscono gli antigeni e in seguito migrano nei linfonodi, contribuendo all'innesco della risposta immunitaria.

Nel sangue queste cellule appartengono all'ambito delle cellule mononucleate e presentano al loro interno una serie di sottopopolazioni. Convenzionalmente distinguiamo due grossi gruppi: le **cellule dendritiche convenzionali** cDC (conventional dendritic cells) e le **cellule dendritiche plasmacitoidi**. A loro volta le cellule dendritiche convenzionali si suddividono in sottopopolazioni.

- le CD1c-positive DC che rappresentano il 25% delle DC convenzionali

- le CD141-positive DC che sono la popolazione meno frequente all'interno del gruppo

- le slan-DC, caratterizzate dall'antigene SLAN, che sono le più rappresentate all'interno di questo gruppo

Queste diverse sottoclassi di DC si distinguono in base a vari marcatori presenti sulla loro superficie e alla loro capacità di produrre citochine in risposta a stimoli che agiscono ad esempio sui toll-like receptor. All'interno di questi sottogruppi le slan-DC sono quelle capaci di produrre elevate quantità di TNF e IL-12. Anche la CD1c+ e le CD141+ producono queste citochine ma in quantità inferiori rispetto alle slan-DC. Recentemente si è scoperto che le CD141+ producono una nuova categoria di interferoni, gli interferoni lambda. Anche le altre sottoclassi producono interferone lambda però le CD141+ sono più efficaci nel produrre questo interferone.

Le cellule plasmacitoidi sono specializzate nel produrre IFN-alfa e risultano molto potenti rispetto alle altre se attivate da stimoli in comune alle DC convenzionali o da stimoli specifici; le cellule plasmacitoidi sono di fatto quelle cellule che da sempre sono considerate responsabili della produzione degli IFN di tipo I durante le infezioni virali. Hanno tre sottopopolazioni al loro interno come spiegato in figura su cui non ci soffermiamo. Nel topo si riconoscono ulteriori gruppi.

Vie di segnalazione dei TLR nelle dendritiche convenzionali e plasmacitoidi (*Slide 9*)

Le DC convenzionali e le DC plasmacitoidi esprimono toll-like receptor endosomiali diversi: le cDC non esprimono TLR7 e TLR9 (in realtà ne esprimono bassi livelli), bensì il TLR3 e producono IFN-beta in risposta a dsRna, mentre le pDC esprimono TLR7 e TLR9 e attivano la via di trasduzione mediata da MyD88 che porta alla produzione di IFN-alfa.

Un'altra peculiarità è che le plasmacitoidi sono le uniche caratterizzate dall'espressione costituiva del fattore di trascrizione IRF-7 (TLR9 funziona via IRF-7), le altre invece utilizzano IRF-3. Le altre cellule come le dendritiche convenzionali possono anche loro esprimere IRF-7 perché questo viene indotto in quanto è uno degli interferon responsive genes. Quindi TLR3 attiva IRF-3, il quale induce la produzione interferoni di tipo I, in modo particolare ifn beta e induce l'espressione di IRF-7 e di altri geni. L'interferone beta viene rilasciato e funziona in maniera autocrina e utilizza IRF7 che è stato neosintetizzato. Quindi si ha un'amplificazione continua della produzione di interferoni di tipo I: parte la produzione l'interferone beta (indotto da IRF-3) e poi continua con l'interferone alfa (indotto da IRF-7).

Quindi ripetendo abbiamo una distinzione fondamentale tra le dendritiche: le conventional DC esprimono TLR3 mentre le plasmacitoidi esprimono TLR7 e TLR9 e per lo meno nelle fasi iniziaIi della risposta ai PAMP e agli acidi nucleici le prime utilizzano IRF-3 e le seconde IRF7.

Fonti di IFN-I durante le infezioni virali (*slide 10*)

Da sempre in maniera dogmatica le cellule plasmacitoidi sono considerate le maggiori produttrici di interferone di tipo I (via TLR7 e TLR9 e altri recettori). Questo però è vero solo nelle prime fasi di un' infezione virale, le cellule plasmacitoidi sono infatti impegnate all'inizio e sono responsabili del picco iniziale della produzione di interferoni. Nelle fasi successive intervengono anche gli altri leucociti che contribuiscono alla produzione di interferone (attraverso TLR3 e altri recettori citoplasmatici che riconoscono acidi nucleici di origine virale). Quindi le plasmacitoidi non sono le uniche a produrre IFN, ma sono sicuramente le più importanti nelle prime fasi.

Azione degli interferoni di tipo I

Gli interferoni di tipo I utilizzano meccanismi diretti e indiretti per eliminare i virus e/o le cellule infettate dai virus.

Uno dei meccanismi diretti è rappresentato dalla capacità degli interferoni di tipo I (quindi alfa e beta e oggi si sa che contribuiscono anche gli interferoni lambda cioè gli interferoni di tipo III) di inibire direttamente la replicazione di un virus che infetta la cellula attraverso la produzione di uno "stato antivirale". Quando una cellula è infettata riconosce e risponde al virus estraneo grazie ai toll-like receptor descritti prima e produce immediatamente e rapidamente interferone di tipo I, il quale una volta rilasciato va a proteggere le cellule vicine. La cellula che è sta infettata non è più recuperabile ma si sacrifica per proteggere le cellule vicine. L'interferone che viene rilasciato si lega a un recettore posto su una cellula vicina presubilmente non ancora infettata e attiva uno stato antivirale che permette alla cellula di resistere alla replicazione del virus nel momento in cui il virus la infetta.

L'interferone blocca la replicazione virale. Come avviene? L'interferone blocca la sintesi proteica virale bloccando l'apparato sintetico della cellula attraverso l'induzione di una serie di enzimi e questo impedisce la replicazione e la formazione di virioni.

Regolatori negativi dei toll-like receptors

La parte seguente è un breve riassunto dei TLR **(Slide 12**). TLR localizzati sulla membrana stimolano citochine proinfiammatorie (indotte da NF-kB che è il fattore di trascrizione cruciale ed è attivato attraverso MyD88), mentre quelli localizzati negli endosomi attivano gli interferoni di tipo I. L'attivazione trascrizionale degli interferoni ha bisogno di IRF3 o IRF7, i fattori di trascrizione principali.

TLR7/8 e TLR9 utilizzano la proteina adattatrice MyD88 che può attivare la via di trascrizione sia di IRF-7 sia di NF-kB

TL3 e TLR4 attraverso la proteina adattatrice TRIF attivano e fosforilano IRF-3 che è poi in grado di attivare l'espressione dell'interferone beta.

Esistono molti regolatori negativi delle vie di trasduzione dei toll-like receptor e parlandone apriamo un discorso piuttosto ampio. Iniziamo a descrivere alcuni aspetti. Primo, l'espressione di questi regolatori varia a seconda del tipo di cellula. Secondo, questi regolatori possono essere già presenti e quindi modulare il segnale man mano che la cascata si attiva. Terzo, possono essere inducibili, ossia le vie di trasduzione attivate dai TLR possono tra i geni che attivano includere anche alcuni di questi regolatori negativi. Quarto, queste proteine vanno a inibire, bloccare,

sequestrare, disattivare i vari componenti della via di trasduzione attiva, spegnendo il segnale di trasduzione.

Per citarne alcuni: (tabella **slide 13**)

- **SIGIRR**, un recettore di membrana che può essere indotto e può sequestrare IRAF e TRAK6

- **TAG**, variante di TRAM dovuta ad uno splicing differenziale (TRAM è una proteina adattatrice che permette di attivare la via TRIF dipendente da TLR4), blocca l'interazione fra TRAM e TRIF e quindi spegne il segnale che porta alla produzione di interferone

- **IRAK-M**, una proteina della famiglia IRAK che non possiede però il dominio chinasico tipico delle IRAK, previene la dissociazione di IRAK1 e IRAK4 da MyD88 e quindi spegne il segnale

- **SOCS**, di cui parleremo, proteine indotte dalle citochine.

Le vie di trasduzione attivate da recettori che appartengono a famiglie diverse possono parlarsi e quindi in certi casi possono sinergizzare o avere effetto additivo per quel che riguarda una determinata funzione, in altri casi invece segnali di trasduzione attivati da vie diverse possono inibirsi o modulare la risposta.

Tra i regolatori negativi facciamo l'esempio seguendo la **slide 14** dei regolatori negativi della via TRIF-dipendente. Le **slides 15 e 16** mostrano gli inibitori negativi della via TRIF-dipendente e MyD88-dipendente. A tutti i livelli della cascata ci possono essere delle proteine che hanno un ruolo negativo o perché dissociano i componenti o perché ne attivano la degradazione o perché spengono l'attivazione o impediscono il legame al DNA ecc..

Un'altra categoria di modulatori del signaling, che sta prendendo piede nell'ambito della ricerca in tante vie di trasduzione non solo dei TLR ma anche dei tumori, sono i **microRNA**. Si tratta di RNA molto corti in grado di legare mRNA bersaglio a livello del 5' e del 3' impedendo la trascrizione del messaggero; in questo modo possono modulare una determinata via di trasduzione e quindi una determinata funzione. Come mostra la slide 16 lo stesso TLR4 attraverso NF-kB (e anche attraverso la via TRIF-dipendente) può indurre la trascrizione dei precursori dei microRNA, i quali maturano, escono nel citoplasma e vanno a inibire l'espressione di tutti i componenti della via di trasduzione attivata da TLR4. Quindi lo stesso TLR4 è in grado di spegnere la via di trasduzione che lui stesso innesca attraverso microRNA. Il concetto è che c'è una continua regolazione del segnale di trasduzione addirittura attivato dallo stesso stimolo e che serve a modulare o a spegnere il segnale stesso.

Strategie usate dai patogeni per evadere il signaling dei TLR (*slide 17*)

Gli agenti patogeni tentano di evadere la risposta dell'ospite interferendo negativamente con i meccanismi che l'ospite attua per la loro eliminazione in maniera molto mirata. Tra le varie strategie utilizzate per evadere il sistema immunitario virus e batteri sono in grado di interferire con il signaling dei TLR e come vedremo poi anche dei PRR, prevenendo il loro riconoscimento da parte dei recettori dell'ospite oppure bloccando proteine implicate nella via di trasduzione. Ci sono molti esempi. Molto spesso studiando la patogenesi delle infezioni da parte di agenti patogeni si impara a capire come funziona il signaling di un determinato pattern recognition receptor.

Esempi di strategie usate dai virus per evadere il signalling dei TLR4. Il virus dell'herpes simplex, i poxvirus e il virus dell'epatite c ecc. possono codificare all'interno del loro genoma delle proteasi che degradano varie proteine implicate nella trasduzione e in questa maniera possono bloccare la produzione di interferone di tipo I. MyD88, IRAK, TRIF, TBK1 possono essere bersaglio di questi prodotti virali, bersaglio di degradazione o di inibizione.

DAMPs

I toll-like receptors e i vari PRR sono in grado di riconoscere un'altra categoria di ligandi, i DAMPs, cioè damage-associated molecular patterns, chiamati da altri anche allarmine in quanto sono sostanze rilasciate dalle cellule necrotiche e che le cellule del sistema immunitario riconoscono come pericolose. (Chi chiama i DAMPs allarmine in realtà considera che i DAMPs includono i PAMPs e le allarmine). Ci sono quindi prodotti microbici PAMPs e prodotti di origine cellulare che funzionano da allarmine che chiamiamo DAMPs. La tabella nella **slide 18** elenca alcuni DAMPs:

- HSPs (Heat Shock Proteins) proteine normalmente intracellulari con funzione di trasportatori all'interno della cellula

- Cristalli tra cui l'urato monosodico, responsabile della patologia della gotta

- Proteine nucleari come ad esempio HMGB1, un fattore di trascrizione molto potente che attiva geni proinfiammatori. In determinate situazioni, soprattutto quando le cellule vanno incontro a necrosi, viene rilasciato all'esterno e viene riconosciuto come proteina estranea contro cui le cellule del sistema immunitario reagiscono. HMGB1 per esempio lega TLR4.

La **slide 19** mostra un esempio di quando può avvenire il rilascio di DAMPs, cioè quando c'è un insulto molto tossico che manda la cellula in necrosi. La cellula necrotica rilascia il suo contenuto all'esterno e può rilasciare una serie di DAMPs: HMGB1, acido urico, cromatina (in questo caso si tratta di DNA della cellula ospite che può essere rilasciato all'esterno in forma di DNA o cromatina e ciò è molto pericoloso perché può dare origine a malattie autoimmuni), HSPs, adenosina e altre proteine intracellulari. Il contenuto intracellulare che normalmente non esiste all'esterno viene immediatamente riconosciuto dai DAMP receptors, cioè i vari PRR. Le **diapositive 20 e 21** riportano alcuni esempi di recettori che legano questi DAMPs. TLR3 può riconoscere RNA dell'ospite. Ovviamente nel caso di acidi nucleici dell'ospite esistono dei sistemi per impedirne il riconoscimento da parte dei PRR quando sono rilasciati all'esterno. Persino all'interno della cellula ospite esistono dei sistemi di protezione, cioè una serie di ribonucleasi che sono enzimi che degradano gli acidi nucleici in modo da prevenire il riconoscimento da parte dei toll-like receptors o di altri sensori intracellulari.

Slide 20. Rna è legato da TLR3, Dna è legato da TLR9, Acido urico da NALP-3, HMGB1 da TLR4, HSP da TLR4 ecc

Questi toll-like receptor rispondono ai DAMPs come risponderebbero ai PAMPs, attivando le stesse risposte, innescando la produzione di citochine proinfiammatorie e producendo quella che si definisce un'infiammazione sterile, in quanto avviene in assenza di un agente patogeno. L'infiammazione sterile ha tutti i caratteri di una risposta infiammatoria normale con tanto di produzione di sostanze tossiche che vanno a uccidere cellule vicine sane, "innocenti" e queste rilasciano queste proteine, amplificando quindi la risposta infiammatoria.

TLR7 e i TLR9 potrebbero giocare un ruolo importante nel riconoscere gli acidi nucleici endogeni e nell'attivare le risposte. Come vedete nelle **figure 22 e 23** l'acido nucleico endogeno rilasciato dalla

cellula danneggiata ha bisogno di legarsi a una serie di proteine come LL37, anticorpi, HMGB (queste proteine funzionano loro stesse da DAMPs). Queste proteine legano recettori sulla superficie delle cellule dell'ospite, ad esempio il recettore per Fc presente sulle cellule plasmacitoidi e sono responsabili del trasporto degli acidi nucleici endogeni agli endolisosomi dove gli acidi nucleici dell'ospite sono riconosciuti da TLR7 e TLR9, i quali stimolano la produzione di interferoni di tipo I.

Ruolo dei toll- like receptors in alcune patologie

TLR7 e TLR9 sono implicati nella patogenesi di alcune malattie autoimmuni per esempio il **lupus eritematoso sistemico (slide 24)**. Questa patologia è caratterizzata dalla produzione di autoanticorpi contro gli acidi nucleici dell'ospite che provocano gravi danni (all'origine evidentemente c'è un danno eziologico che provoca il rilascio di acidi nucleici, l'eziologia del lupus non è ancora chiara). Nella patogenesi del lupus gioca un ruolo importante anche l'interferone di tipo I, soprattutto IFN alfa. Le cellule dei pazienti con lupus si dice che hanno una signature di tipo interferone perché se si studia l'espressione dei geni nei leucocoti di questi pazienti si nota che queste cellule hanno un'elevata espressione di geni che normalmente sono attivati dall'interferone di tipo I. Ciò perché in questi pazienti gli acidi nucleici dell'ospite vanno a legare TLR7 e TLR9 e inducono le cellule plasmacitoidi a produrre continuamente interferone di tipo I, che viene prodotto in maniera incontrollata provocando tutta una serie di effetti.

Anche i NETs rilasciati dai neutrofili contribuiscono alla patogenesi del lupus. (**slide 25**) I NETs sono loro stessi costituiti da cromatina complessata a varie proteine ad esempio proprio LL37. I NETs possono stimolare le cellule plasmacitoidi a produrre interferone di tipo I. IFN-I a sua volta può favorire la produzione dei NETs, quindi si instaura un circuito a feedback positivo che continuamente provoca la produzione di IFN-I. Si crea un circuito, un network cellulare che coinvolge neutrofili, cellule plasmacitoidi, linfociti B. Anche i linfociti B hanno TLR7 e TLR9 e producono gli autoanticorpi che sono responsabili del danno.

I toll like receptors sono quindi anche implicati nella patogenesi di alcune malattie, soprattutto malattie autoimmuni, malattie infiammatorie croniche e altre. Ultimamente stanno emergendo anche ruoli interessanti nei tumori. Le risposte attivate da questi recettori sono molto aumentate quindi possono magari contribuire allo sviluppo dei tumori.

Per concludere c'è un grandissimo interesse nel tentare di modulare la funzione di questi recettori. Vi sono delle sostanze sintetiche che possono attivare o inibire in maniera specifica i TLR, a livello recettoriale o dei vari sistemi di trasduzione. Ve ne ricordo solo uno che da anni è usato in certe patologie, l'iniquimod, una sostanza sintetica, che veniva usato ancora prima della scoperta dei toll-like receptor per trattare alcune infezioni virali dei genitali; questa sostanza funziona bene anche in altre patologie. L'iniquimod lega e stimola TLR7/8.

C-type lectin-like receptors

I C-type lectin-like receptors sono un'altra famiglia di recettori che appartiene ai PRR (Pattern recognition receptor). Questi recettori sono espressi principalmente sulla membrana dei fagociti e sono implicati soprattutto nella risposta contro i funghi. Legano carboidrati presenti sulla superficie microbica (questi carboidrati sono ricchi di mannosio e fruttosio nella regione terminale) e glucano, espresso soprattutto nelle pareti dei funghi e in alcuni batteri (per esempio i micobatteri). Esempi di questi recettori sono DECTIN e il recettore per il mannosio.

Il recettore prototipo di questa famiglia è DECTIN-1 e come tutti i membri di questa famiglia attiva un signaling mediato dalla chinasi SYK (**slide 31**). Questa chinasi è in grado di attivare diverse cascate e ancora una volta è molto importante l'attivazione di NF-kB che insieme ad altri fattori di trascrizione attiva un programma di trascrizione di geni che codificano per diversi mediatori proinfiammatori, soprattutto citochine infiammatorie. Questa famiglia si suddivide in diversi sottogruppi (dectin 1, dectin 2, ecc) che differiscono per i domini presenti nella porzione intracellulare. Molti esprimono domini ITAM (di cui avete sentito parlare nei Fc receptor) o associano molecole di trasduzione contenenti questi domini, mentre altri hanno invece domini inibitori ITIM.

La slide 33 presenta una figura dettagliata con i geni attivati da ciascuno di questi recettori.

Signaling dei C-type lectin-like receptors nell'immunità acquisita (*slide 35*)

Questi recettori sono implicati in risposte contro in funghi. Le citochine attivate dai C-type lectin-like receptors (TGF-beta, IL-1beta, IL-6 e IL-23 da una parte e IL-12 dall'altra) sono fondamentali per istruire i linfociti T naive a polarizzarsi rispettivamente nei TH17 e nei TH1, che sono le cellule dell'immunità acquisita che l'ospite utilizza per eliminare i funghi. Le cellule TH17 producono le citochine IL-17 e IL-22 che attivano la produzione di peptidi antimicrobici e il reclutamento dei neutrofili, i quali fagocitano, sparano radicali, rilasciano enzimi e eliminano i funghi. I linfociti TH1 innescano l'immunità cellulo mediata attraverso la produzione di interferone gamma. Questi recettori attivano una risposta TH1 o TH17 a seconda del tipo di patogeno. Nel caso di funghi e di patogeni extracellulari l'ospite monterà una risposta TH17, mentre nel caso di patogeni intracellulari come micobacterium monterà la risposta cellulo mediata, quindi ha bisogno di TH1 e interferone gamma che orchestra tutte le cellule dell'immunità cellulo mediata. Quindi questi recettori devono buttare fuori quelle citochine capaci di promuovere quell'ambiente che favorirà la polarizzazione dell'uno o dell'altro tipo o dei due tipi insieme a seconda dei casi.

Slide 35

Questa rappresentazione schematizza le principali vie di trasduzione usate dai PRR.

- I toll-like receptor di membrana utilizzano MyD88 per attivare NF-kB (via MyD88-dependent)

- I recettori DECTIN funzionano attraverso SYK e attivano NF-kB.

- Altri toll-like receptor utilizzano TRIF per attivare la via che porta alla produzione di interferoni di tipo I. (via TRIF-dependent)

In questa figura sono illustrati anche dei PRR citoplasmatici (contrapposti a quelli di membrana e endosomiali) rappresentati da RIG-I e MDA-5 e dai recettori della famiglia dei NOD-like receptors. Come vedete questi utilizzano più o meno le stesse vie di trasduzione.

PRR citoplasmatici *(slide 36)*

I PRR citoplasmatici sono sensori specializzati presenti nel citoplasma e si possono suddividere in recettori che riconoscono PAMP microbici rappresentati da proteine o componenti strutturali oppure che riconoscono PAMP microbici rappresentati da acidi nucleici. Questi ultimi includono recettori che riconoscono RNA a singola o a doppia elica e recettori che riconoscono il DNA (di cui sappiamo meno). I NOD-like receptors (NLR) sono invece i recettori che riconoscono i componenti strutturali microbici e a loro volta si suddividono in vari gruppi.

Riconoscimento dei prodotti virali da parte dei PRR

La figura 37 illustra in generale il ciclo di infezione e replicazione di un virus. L'entrata del virus nella cellula può avvenire attraverso meccanismi di fusione tra le membrane o attraverso endocitosi mediata da recettore. Dopodiché il virus si spoglia e libera gli acidi nucleici che possono avere vario destino: possono seguire il ciclo di replicazione o di traduzione o essere riconosciuti dai recettori per i patogeni dell'ospite. Gli acidi nucleici si assemblano insieme alle proteine strutturali a formare il virione e il virus può infine essere rilasciato con varie modalità: per distruzione della cellula, per estroflessione, per budding ecc.. Esistono molti momenti in cui ci possono essere acidi nucleici virali liberi nel citoplasma.

Nel caso dei virus esistono diverse possibilità usate dall'ospite per riconoscere questi patogeni (figura 38). Il riconoscimento dei virus può avvenire attraverso recettori situati a livello della membrana, per esempio TLR2 e TLR4, che riconoscono proteine della superficie virale, oppure attraverso recettori endosomiali che legano dsRNA di origine virale negli endosomi oppure infine attraverso i recettori citoplasmatici RIG-I e MDA5, specializzati nel riconoscere dsRNA libero di origine virale nel citoplasma. Perché riconoscono l'RNA a doppia elica di origine virale? DsRNA di origine virale presenta una struttura diversa dall'RNA endogeno e questo permette quindi il suo riconoscimento.

Il concetto generale è che i sistemi di riconoscimento degli acidi nucleici virali innescano segnali di trasduzione che portano all'induzione dell'interferone beta. Nelle fasi iniziali si ha quindi la produzione di questo interferone beta che viene rilasciato e lega recettori delle cellule vicine, attivando l'espressione genica dipendente dall'interferone beta.

RIG I-like receptors

RIG-I e MDA5 costituiscono i RIG I-like receptors e fanno parte della famiglia delle elicasi in quanto sono composti da domini di questa superfamiglia. Questi recettori possono riconoscere poli (I:C) che è un RNA sintetico a doppia elica che mima perfettamente l'azione degli RNA a doppia elica virali. Poli (I:C) veniva utilizzato ancora prima della scoperta di questi recettori e la scoperta di questi ha permesso di capire come funziona il poli (I:C). Un terzo membro della famiglia dei RIG I-like receptor è LGP-2, il cui ruolo in realtà non è ancora chiaro. Secondo alcuni studi ha un ruolo negativo, secondo altri collabora con questi recettori potenziandone la funzione, altri ancora sostengono che magari lavori come recettore in grado di legare questi acidi nucleici.

I ligandi RIG-I e MDA5 sono dsRNA. Stiamo imparando a conoscere quali sono i virus che interagiscono con l'uno o con l'altro recettore, alcuni dei quali sono specificati nella figura 42. Poli (I:C) differenti possono legare sia l'uno che l'altro.

La slide 41 mostra le rappresentazioni strutturali di questi recettori che sono composti da vari domini importanti per la loro funzione, per il legame con i PAMP e per l'interazione con altre proteine. I domini CARD ad esempio sono fondamentali per l'interazione tra i vari membri e per l'interazione con la proteina adattatrice MAVS. MAVS (un altro nome è IPS1) è una proteina

importantissima nella via di segnalazione di questi recettori e la sua funzione è analoga a quella delle proteine adattatrici dei toll-like receptors.

(Slide 44) Quando RIG-I e MDA5 legano dsRNA di origine virale si attivano, interagiscono con la proteina MAVS che si trova nel reticolo (secondo un'altra diapositiva MAVS si trova legato ai mitocondri), la quale attiva un segnale di trasduzione che attiva l'espressione di IFN-I. La proteina MAVS possiede un dominio CARD che permette l'interazione tra questi complessi che mediano il segnale.

La figura 44 aggiunge un ulteriore dettaglio. Normalmente queste elicasi, qui è riportato l'esempio di RIG-I, si trovano inattive nel citoplasma in quanto come mostra questa figura questi sensori si trovano allo stato ripiegato. Quando una cellula viene infettata, si libera RNA virale, questo replica e durante il ciclo di replicazione si formano come prodotti intermedi RNA a doppia elica. Quando questo dsRNA virale viene riconosciuto, RIG-I si apre, non viene più mantenuto inibito, si dispiega e libera i domini CARD che prima erano mascherati dall'interazione con questo dominio e quindi non potevano funzionare. I domini CARD possono ora interagire con IPS-1/MAVS/Cardiff (questi nomi indicano la stessa proteina, la quale ha tanti nomi perché è stata clonata contemporaneamente da gruppi diversi) che attivano il segnale di trasduzione.Qual è il segnale di trasduzione attivato da RIG-I e MDA5 attraverso IPS-1? Praticamente si attiva l'asse TBK1 - IRF3/7 che attiva gli interferoni di tipo I. (L'asse TBK1- IRF3/7 che attiva IFN-I è utilizzata anche dai toll-like receptor).

La Figura 45 mostra che RIG-I e MDA-5 possono riconoscere anche DNA citoplasmatico e attivare l'asse TBK1 - IRF3/7 e il sistema NF-kB. Output: tra i geni attivati attraverso queste via ci sono: CCL5 e CXCL10 (che reclutano monociti, fagociti, linfociti, cellule dendritiche), citochine infiammatorie (per esempio IL-6) e geni implicati nelle risposte antivirali (interferone alfa e beta, IRF7 per amplificare la risposta)

Slide 47

Questa slide è già stata commentata parlando delle cellule dendritiche. Le cellule dendritiche sono fondamentali perché rispetto a tutti gli altri tipi di leucociti sono quelle che producono tonnellate di citochine: una cellula dendritica lavora 100-500 volte quanto una cellula di un'altra popolazione. Queste cellule sono dunque fondamentali per la capacità di produrre citochine e promuovere lo stato antivirale. Le pDC hanno un'espressione quasi selettiva dei TLR7 e TLR9, le cellule dendritiche convenzionali esprimono invece TLR3 e anche recettori citoplasmatici che riconoscono l'RNA (anche le cellule plasmacitoidi esprimono questi recettori citoplasmatici ma sono meno importanti). I sistemi di trasduzione attivati da questi recettori portano alla produzione di citochine proinfiammatorie (attraverso NF-kB) e interferoni di tipo I (attraverso IRF3 o IRF7, asse TBK1-IRF3 o TBK1-IRF7).

Lezione di Patologia generale e fisiopatologia clinica (sem2) del 27/2/2013 (1)

Fisiopatologia clinica, prof. Minuz

La funzione di circolo é indispensabile perché il sangue deve fornire ossigeno alle cellule ed ai tessuti, ed essa è legata a tre, sostanzialmente, elementi fondamentali.

Perché la funzione circolatoria sia mantenuta é necessario infatti che ci sia un cuore che pompi adeguatamente ed é necessario che ci sia un adeguato volume ematico; il terzo elemento é uno stato di circolo adeguato: perché ci sia un circolo adeguato è necessaria un'adeguata pressione di riempimento vascolare.

La pressione si determina sulla base di alcuni parametri, due dei quali sono quelli che vi ho descritto, il terzo é la funzione vascolare in sé, ed é mantenuta relativamente costante entro una variabilità piuttosto limitata.

Tuttavia ci sono delle condizioni nelle quali questa capacità di regolazione, che é fondamentale per la funzione circolatoria, é alterata.

Le variazioni di pressione possono essere verso l'alto, per cui i livelli pressione tendono a essere stabilmente più elevati di quelli attesi, e questo ha delle ripercussioni sulla funzionalità cardiaca e sullo stato dei vasi arteriosi; dall'altra ci possono essere delle condizioni in cui il controllo pressorio può essere inadeguato e la pressione non viene mantenuta.

La condizione tipica di tutto ciò é lo shock anafilattico: ad esempio la puntura di insetto che inocula un veleno nelle arterie che determina una risposta di tipo anafilattico, che porta a perdita del controllo vasomotorio per alterazione della permeabilità e del tono vascolare.

Abbiamo due condizioni estreme: la possibilità di avere una pressione più alta, e la possibilità di avere una pressione più bassa; la condizione di ipertensione arteriosa, cioé lo stato di incremento cronico della pressione arteriosa, è una condizione estremamente frequente ed é responsabile di molti degli eventi cardiovascolari (ossia delle morti per malattie cardiovascolari).

Abbiamo cominciato a descrivere l'aspetto del controllo vasomotorio e l'aspetto del controllo dell'emodinamica attraverso l'analisi delle modificazioni del comportamento dei valori pressori del primo tratto del circolo sistemico arterioso, cioé nelle grosse arterie. Nell'aorta la struttura di parete é sostanzialmente una struttura non muscolare (negli animali di grossa taglia,compreso l'uomo). Tale struttura ha delle caratteristiche intrinseche di distensibilità (una capacità di modificare il diametro in risposta all'aumento di pressione della parete), che sono date dalle strutture elastiche, e una piccolissima o quasi nulla capacità contrattile.

Questa funzione è estremamente importante ed é importante che sia mantenuta perché, come si può vedere dalla parte bassa (*riferimento slide NdR),*quando il sangue viene spinto in avanti dal cuore ed entra nel circolo sistemico, determina in fase sistolica una pressione che viene esercitata sulla parete e una longitudinalmente, ma quella che importa é quella che si esercita sulla parete. La pressione di parete è quella che noi registriamo come valore di pressione, e che determina un allargamento del vaso. Questo allargamento attenua l'ampiezza dell'onda,e in una certa misura serve da contenimento e non da variazione di pressione; aumentando il volume si riesce a determinare una minore ampiezza dell'onda sistolica.

Nella fase diastolica le caratteristiche di elasticità permettono un ritorno elastico: questo contribuisce a determinare un valore di pressione nella fase diastolica.

Uno degli aspetti determinanti del circolo sistemico é che a differenza di quello che avviene nelle cavità cardiache, dove si ha una pressione elevata nella fase sistolica e una pressione molto bassa, prossima allo zero, nella fase diastolica, nel circolo arterioso si determina una flessione in diastole.

Il primo contribuente alla pressione in diastole é quindi la capacità elastica della parete vascolare aortica.

Nella progressione si determina una progressione dell'onda che arriva alla biforcazione aortica, dove si generano delle onde riflesse; l'onda riflessa è importante perchè funge da amplificatore dell'onda di polso.

Temporalmente si colloca a valle, cioé prima c'è l'onda di andata e poi l'onda riflessa che é la seconda componente dell'onda sfigmica.

Tuttavia può accadere che un'aumentata rigidità dell'aorta possa determinare modificazioni dell'onda, e questo avviene per due ragioni. La prima é che se la parete é rigida, (dovete immaginare di spingere in modo pulsatile del liquido all'interno di un tubo metallico), avremo una caduta di pressione dall'inizio alla fine del tubo che é funzione della lunghezza e del diametro, ma non abbiamo l'attenuazione dell'onda della pressione durante la fase di spinta (fase sistolica), e non abbiamo la generazione di una pressione diastolica durante la fase di non uscita del liquido.

L’aorta può divenire più rigida abbastanza frequentemente come conseguenza di una malattia che é l'aterosclerosi. Essa colpisce le arterie di grosso calibro e coinvolge essenzialmente tutta la parete vascolare; si ha un ingrossamento dell'intima attraverso il deposito di materiale lipidico e l'organizzazione parziale di un tessuto fibroso con componente muscolare molto modesta e l'accumulo di cellule che hanno inglobato i lipidi.

L'ispessimento dell'intima, quindi alterazioni della media e dell'avventizia che accompagnano l'aterosclerosi, determinano,soprattutto con la presenza di calcificazioni vascolari all'interno della parete del vaso, una maggiore rigidità. Un'aorta affetta da aterosclerosi é un'aorta più rigida, nella quale la distensione della parete vascolare durante il passaggio dell'onda sfigmica non avviene, e quindi avviene una maggiore trasmissione e una maggiore velocità di transito dell'onda.

Una maggiore ampiezza e una maggiore velocità di transito dell'onda determinano un'anticipazione dell'onda riflessa che va a cadere sull'onda sfigmica; questo é quello che succede se avete un vaso molto rigido, il tempo di transito si riduce e l'onda attraversa il vaso in un tempo più ridotto.

Inoltre, nella fase diastolica, si ha un'anticipazione dell'onda riflessa che va a cadere sull'onda primaria e che quindi determina una maggiore ampiezza.

Il risultato di tutto ciò é che la parete vascolare subisce dei livelli di pressione maggiori: quindi la parete rigida di un'aorta con una malattia aterosclerotica, subisce uno stress di parete maggiore.

Siccome nella porzione prossimale della biforcazione iliaca si determina maggiormente l'ampiezza maggiore dell'onda primaria e l'anticipazione dell'onda riflessa, è proprio in questa sede che avviene una spinta maggiore sulla parete, un maggiore stress di parete, ed è qui che si determina la formazione dei cosiddetti “**aneurismi**”.

L'aneurisma dell'aorta addominale é dovuto al fatto che l'iniziale aumento di rigidità della parete insieme ad alti livelli di pressione e l'ampiezza maggiore dell'onda sfigmica, determinano uno stress di parete nella fase sistolica molto elevato e, per la legge di La Place, una tendenza a un' impossibilità di adattamento della struttura attraverso un ispessimento, e dunque una progressiva perdita della morfologia, per cui tende a dilatare. Questo è un po' quello che accade, con meccanismi diversi e con delle porzioni temporali molto diverse, a livello cardiaco: l'aumentato stress di parete determina uno sfiancamento della parete vascolare che determina la formazione degli aneurismi addominali nell'aorta che sono localizzati lì proprio perchè è il punto in cui si somma maggiormente i vari fattori, cioè l'ampiezza maggiore dell'onda di polso che determina l'elevato stress di parete.

Quindi nella prima porzione del ciclo sistemico abbiamo vasi che arrivano a svolgere due compiti:
1- trasmettere in avanti l'onda, trasmettere il sangue in avanti

2- attenuare l'ampiezza della variabilità sistolo-diastolica della pressione che é presente nel cuore.

In funzione di questa capacità elastica, del ritorno elastico, del modulo elastico dell'aorta, si determina una pressione di riempimento anche in diastole. Però a determinare una pressione di riempimento in diastole non è compito solo dei grossi vasi di conduzione, é compito anche del circolo con parete muscolare, i vasi arteriosi di calibro minore, le cosiddette “**arteriole di resistenza”**, cioè quel circolo che é localizzato a livello dei tessuti essenzialmente, dove ci sono vasi compresi tra i 200 e 50 micron, dotati di una organizzata struttura parietale muscolare, che sono in grado attraverso una modulazione del tono vascolare e la modulazione del calibro del vaso, di determinare una pressione a valle attraverso un'azione di incremento o decremento delle resistenze del circolo.

Esempio:abbiamo un tubo di gomma: apro il rubinetto e l'acqua esce a getto discontinuo,(pompa peristaltica) il vaso elastico attenua un pochino l'ampiezza, però se io voglio aumentare la

pressione di riempimento, stringo a valle: in questo modo determino un aumento delle resistenze al flusso e di conseguenza un aumento delle resistenze a monte.

Quindi la pressione diastolica si determina perchè a valle delle grosse arterie di conduzione ci sono arterie di piccolo calibro che offrono una maggiore resistenza al flusso di quanto facessero le arterie più grosse, e questo, insieme all'elasticità delle grosse arterie, attenua la variabilità pressoria sistole-diastolica: il flusso tende a trasformarsi in un flusso continuo.

C'è una relazione diretta tra pressione e diametro.

Andando avanti in un circolo di arterie di calibro minore, all'interno del lume del vaso di quelle arterie la pressione sarà più bassa; se io offro una resistenza al flusso, la pressione aumenta a monte, però la pressione di parete in quell'arteria sarà minore.

Se io ho calibro uguale a 1 e pressione 100, se riduco il calibro la pressione in questo tratto sarà minore.

Siccome c'è un flusso in un'ampiezza, la pressione a valle sarà minore ma più alta di questa(?)

Nel fluire del sangue dal cuore verso la periferia si determina una pressione diastolica, si attenuta l'ampiezza dell'onda di polso, si riduce la pressione media via via che si riduce il calibro del vaso: queste sono le variabili che entrano in gioco nel flusso.

Se aumento il tono vascolare determinando un minor calibro del vaso, come conseguenza avrò flussi a valle con pressioni più basse e a monte un incremento della pressione arteriosa. In questo distretto ampiamente modulante i volumi e le pressioni attraverso la vasocostrizione, io posso determinare le pressioni a monte ma anche i flussi a valle.

Qui (*riferimento slide NdR)* siamo a livello dei tessuti periferici, del circolo periferico, e vedete che a valle del arteriole di resistenza si determina un flusso che é continuo e la pressione é in netta discesa.

Passiamo a livello del circolo capillare in due condizioni assolutamente ottimali per favorire gli scambi: pressione costante e flusso costante; pressione bassa che permette gli scambi in periferia attraverso l'equilibrio di forze idrostatiche e pressione oncotica che a livello capillare.

Quindi la funzionalità del circolo richiede che a valle delle arteriole di resistenza si generi un flusso continuo a pressione costante, e che i valori assoluti di pressione siano bassi in modo da favorire gli scambi a livello capillare.

Se io ho un eccesso di vasocostrizione a questo livello, avrò una riduzione dei flussi a valle:

-se voi prendete uno spavento, la cute diventa pallida perché si ha vasocostrizione e il flusso microcircolatorio è poco rappresentato.

-se correte diventate rossi perchè il flusso sanguigno aumenta e il circolo cutaneo è più irrorato.

Quindi la pressione assoluta di tutto il circolo più il riempimento vascolare, quindi i flussi, determinano la funzionalità del circolo tissutale, il circolo di scambio a livello capillare. Vedremo che ci sono altre variabili che entrano in gioco nel determinare l'entità degli scambi a livello capillare.

I volumi di sangue contenuti nel tratto arterioso del circolo sono relativamente piccoli: quindi in realtà il mantenimento del flusso arterioso é per certi aspetti meno dipendente dai volumi però, essendo anche piccolo, il volume complessivo diventa anche molto sensibile alle variazioni di pressione, quindi il flusso diventa molto dipendente dai livelli di pressione.

Se ho un buon tono vasocostrittore mantengo la pressione, se ho un eccesso di vasodilatazione, (*come nell'esempio della puntura di insetto con una risposta di tipo shock anafilattico)* ho una massiva vasodilatazione e un crollo della pressione a monte e un flusso a valle che si mantiene però a livelli di pressione che non favoriscono gli scambi periferici .

Abbiamo visto due aspetti fino adesso:

1- la distensibilità delle grosse arterie di conduzione che determina, attraverso il ritorno elastico, la pressione in diastole

2- l'entità delle resistenze vascolari offerte dal circolo arteriolare: é ciò che determina la pressione nelle grosse arterie ed che determina i flussi a valle. Quindi é importante che il circolo arteriolare sia ben regolato e vedremo cosa accade quando c'è una cattiva regolazione del circolo attraverso un cattivo funzionamento del tono vasomotorio a livello delle arteriole

Quindi se noi consideriamo stabile la funzione cardiaca, due sono i parametri; per il momento non consideriamo il volume, ma il secondo elemento a determinare la pressione, i parametri di circolo, sono le resistenze periferiche: è fondamentale che le resistenze vascolari siano costanti nel tempo, però questo non avviene.

Esempio:-se voi correte, l'ostacolo al flusso si minimizza attraverso un meccanismo di vasodilatazione.

-se voi avete uno spavento,avete una vasocostrizione massiva e avete una riduzione improvvisa del circolo.

Ci sono dei meccanismi di adattamento del tono vascolare che determinano maggiore o minore flusso in periferia,attraverso la modulazione delle resistenze, che operano molto rapidamente.

Ci sono altri meccanismi che intervengono nel determinare i parametri circolatori, quindi principalmente la pressione arteriosa, operando su tempi più lunghi: questi meccanismi possono agire sulle arteriole, ad esempio una tonica vasocostrizione che si determina in certe condizioni sperimentali o genetiche di ipertensione.

Però ci sono altri meccanismi che entrano in gioco nella regolazione a lungo termine, e sono quelli che operano non sul tono vascolare ma sui volumi: se voi avete un eccesso di riempimento vascolare, (mettiamo che il rene sia meno in grado di eliminare acqua e sodio rispetto a quello che é richiesto), si determina un eccesso di volume; se la pressione è determinata dal bilancio tra resistenze vascolari e volumi, ovviamente, un eccesso di volume determinerà un eccesso di pressione arteriosa.

REGOLAZIONE DELLE RESISTENZE

Vediamo per il momento i meccanismi di regolazione della pressione arteriosa che operano sulle resistenze vascolari: sono dei meccanismi che operano in tempi molto rapidi.

L'adattamento del tono vascolare ad un aumento di richieste periferiche nell'esercizio fisico é istantaneo, la vasodilatazione é molto rapida.

Lo spavento che dà vasocostrizione, la determina in tempi molto rapidi.

Quindi vuol dire che ci sono delle sostanze che possono agire sulla muscolatura liscia vascolare, soprattutto nel distretto delle arteriole di resistenza, operando una risposta vasocostrittiva o vasodilatante in tempi molto rapidi. Il primo determinante é sicuramente l'azione delle catecolamine che modula il tono vascolare agendo su dei recettori espressi a livello della muscolatura liscia, determinando una vasocostrizione o una vasodilatazione, dipendente questo dalla localizzazione dei recettori e dal tipo di recettore.

Il sistema é quello barorecettoriale: ci sono dei barocettori localizzati a livello del bulbo carotideo e dell'arco dell'aorta e nei tratti arteriosi prossimali al cuore, che danno delle afferenze che vanno ad un centro vasomotorio e poi delle efferenze che giungono in periferia determinando la risposta vascolare.

La regolazione avviene in un range abbastanza ristretto di valori pressori, cioè è un regolatore funzionale e fisiologico del tono vascolare che é estremamente efficiente in un range di pressioni medie abbastanza ristretto: quindi vuol dire che la regolazione di tipo adrenergico operata attraverso il meccanismo integrato barocettore-centro vasomotorio-effettore periferico sui vasi, è un sistema che funge da modulatore funzionale e fisiologico del tono vascolare.

Se i valori di pressione scendono molto o aumentano molto, il sistema è poco efficace nel controllare l'adattamento vascolare alle variazioni di pressione.

I barocettori, essendo recettori ad alta pressione, sono sensibili allo stiramento, quindi aumentando lo stiramento si determina un'inibizione della risposta simpatica; diminuendo lo stiramento, quindi bassa pressione, si ha un'attivazione della risposta simpatica.

Quindi ho una capacità di adattamento funzionale in un range abbastanza ristretto: (*indica nella slide NdR)*se io ho valori di pressione che scendono sotto i 70 mmHg, la capacità di adattamento pressorio é pressochè nulla, cioè non riesco più attraverso il gioco della risposta adrenergica a modulare la pressione arteriosa; la stessa cosa accade se la pressione sale molto, non posso determinare un'attenuazione della risposta pressoria attraverso una modulazione dell'attività adrenergica.

Quindi il range di funzionalità di questo sistema è nell'ambito delle variazioni pressorie che noi tutti sperimentiamo quotidianamente: distesi, in piedi, attività fisica, a riposo; questa è la funzione della regolazione adrenergica.

-*Ci sono gli stimoli afferenti, che vanno nel nucleo del tratto solitario, nel centro ventrolaterale, e si ha, in caso di stiramento una risposta vagale, se invece si ha una mancata distensione si ha una inibizione della risposta vagale ed un'attività adrenergica maggiore che si esplica come tachicardia e vasocostrizione.*

Quindi la funzionalità del sistema è importante nell'ambito della vita quotidiana: se abbiamo una variazione di pressione, che tutti sperimentiamo, da distesi a in piedi, marcia,seduti, questa variabilità,in assenza di controllo adrenergico,sarebbe estremamente più ampia e avremo dei valori di pressione in certe condizioni molto bassi e molto alti in altre.

Quindi il significato del controllo adrenergico è quello di ridurre la variabilità pressoria: infatti, malattie che condizionano la risposta adrenergica, determinano una maggiore ampiezza della variabilità pressoria.

Questo è un meccanismo che in risposta ad uno stimolo come lo “spavento della visita medica”, permette un adattamento della risposta pressoria nell'arco di pochi minuti: aumenta la pressione, ma modulando l'attività in seguito si riesce a controllare la pressione; quindi la risposta agli stimoli è molto modulata in più o in meno dall'attività simpatica.

E' inoltre fondamentale per un'altra funzione, perchè le pressioni che regolano il circolo sono:

-pressione di flusso

-pressione di parete

-in più noi siamo sottoposti alla **pressione atmosferica** che è determinata dalla forza di gravità terrestre, questa si esercita su tutti i corpi e all'interno del corpo si esercita sui fluidi che sono più liberi di muoversi, quindi anche sul sangue. Se noi quindi passiamo da una posizione distesa ad una

posizione ortostatica, come conseguenza di ciò abbiamo una caduta della pressione arteriosa che è determinata dal fatto che c'è una compartimentazione dei fluidi nelle porzioni più declivi.

Questa è una cosa modesta, però non è priva di significato anche in condizioni fisiologiche: se voi passate da distesi a in piedi, da 400 ml di sangue circa si compartimentalizzano nei distretti venosi agli arti inferiori, di conseguenza il ritorno venoso al cuore si riduce, la spinta in avanti di sangue si riduce, e quindi abbiamo un'incapacità di mantenere flussi e pressioni.

Questo se non ci fosse il controllo adrenergico, perchè in risposta a questo si attivano dei meccanismi di risposta cardiovascolare: il basso riempimento a livello delle grosse arterie determinato da un basso riempimento a livello delle vene, determinerà attivazione della risposta simpatica e quindi una tachicardia ed una vasocostrizione a livello delle arteriole di resistenza che permettono un migliore riempimento a livello cardiaco e a livello del circolo di conduzione; questo ripristina i valori pressori.

Quindi anche una semplice manovra come il passaggio da clino- a ortostatismo può essere estremamente pericolosa in soggetti che hanno **deficit funzionali del simpatico**.

La **sincope** è molto spesso determinata da condizioni banali, una di queste è proprio il passaggio da clino- ad ortostatismo. Se ci si trova in un ambiente molto **caldo**, in cui si ha una risposta vasomotoria attenuata, fuoriuscita di liquidi, perdita di volume, **disidratazione**, quindi una serie di condizioni che **sfavoriscono il circolo**, si può avere una condizione di ipoperfusione cerebrale transitoria, dovuta al fatto che il **riempimento cardiaco era inadeguato**, la **capacità di adattamento cardiovascolare** era **ridotta** e quindi si arriva ad una condizione dei **ipoperfusione cerebrale** che determina una perdita di coscienza. La **perdita di coscienza** determina una **caduta a terra**, questa di per sé arresta il meccanismo.

Quando un soggetto è svenuto cade a terra riprende coscienza perchè il **flusso è mantenuto** dalla posizione clinostatica.

Quando una persona sviene bisogna alzargli le gambe, perchè così facendo si compensa il deficit di riempimento cardiaco.

Se una persona è costretta in una posizione eretta per seri motivi, perchè legata ecc. questo adattamento non è possibile, quindi lo svenimento diventa grave e l'ipoperfusione cerebrale non viene corretta, determinando la possibile morte del soggetto.

Quindi ci sono variazioni di pressione che sono esperienze di tutti, che sono minimizzate grazie al mantenimento di un buon controllo adrenergico.

Il controllo adrenergico è anche responsabile delle variazioni di pressione tra il giorno e la notte: durante il riposo notturno la pressione arteriosa si riduce perchè aumenta il tono vagale.

Quindi la variabilità di pressione che è tipica di ognuno di noi è determinata, tra il giorno e la notte, dal gioco del sistema simpatico perchè sono sempre efferenze di tipo adrenergico quelle che modulano il tono vascolare; il tono colinergico sui vasi è poco rilevante.

Un soggetto che abbia una variazione del tono adrenergico, malattie cerebrovascolari che hanno determinato alterazioni del centro vasomotorio, le malattie cosiddette “neurodegenerative” come il Parkinsonismo che determinano un'alterazione dell'attività adrenergica, determinano anche variazioni del profilo notte-giorno della pressione. Si possono trovare persone anziane con pressioni molto basse di giorno perchè sono in ortostatismo, ed elevazioni rilevanti della pressione arteriosa di notte quando sono distesi, per cui il profilo notte-giorno è assolutamente rovesciato.

Questa è una tipica manifestazione delle malattie, come il Parkinsonismo, che comportano un'alterazione del controllo vasomotorio.

C'è anche una certa variabilità pressoria in funzione della temperatura dell'ambiente: più è alta la temperatura esterna maggiore è l'effetto di una vasodilatazione periferica e si determina una caduta di pressione:esperienza questa comune che col caldo la pressione è più bassa, con il freddo invece si ha vasocostrizione e la pressione è più alta .

L'esercizio fisico è il principale determinante delle variazioni di pressione; se si compie un esercizio fisico, sono due i parametri che si modificano velocemente:

-la frequenza cardiaca quindi la gittata cardiaca

-il flusso alla periferia che aumenta.

Quindi anche in presenza di una vasodilatazione che è distrettuale perchè riguarderà solo la muscolatura che è impegnata nello sforzo, si avrà come risultato un incremento di pressione; quindi ogni attività fisica determina di per sé un incremento della pressione arteriosa.

Chi ha fatto attività fisica avrà fatto dei test ergometrici nei quali viene valutato il consumo di ossigeno e la performance cardiaca, ma gli sarà stata misurata anche la pressione arteriosa e il bilancio della frequenza cardiaca verso l'aumento della pressione arteriosa ci dice quali sono i limiti funzionali di quell'organismo.

Uno sforzo intenso determina un intenso incremento della pressione arteriosa: questo può spingere fuori dal range di autoregolazione della pressione, cioè fuori dalla capacità di controllo adrenergico; posso sviluppare dei livelli di pressione molto pericolosi in cui la modulazione dei flussi non è più attuabile.

Quando la pressione scende, come nelle condizioni che vi ho descritto, quando c'è una normale funzionalità del centro vasomotorio, del controllo vasomotorio, si ha una risposta tachicardizzante e vasocostrittiva.

Questo di per sé agendo sulla gittata cardiaca e sul tono delle arteriole di resistenza, determina un incremento di pressione; determina anche un incremento dei flussi aumentando la gittata cardiaca e quindi i parametri circolatori vengono ripristinati.

Questo è quello che accade ogni volta che ci si siede, ci si alza, ci si distende.

CONTROLLO DEL VOLUME

La pressione arteriosa è quindi modulabile: se però io ho una perdita di volume, il tono adrenergico può agire compensando, attraverso il gioco della frequenza cardiaca aumentata e dell'aumento della vasocostrizione? Fino ad un certo punto.

Se abbiamo un'emorragia, la perdita di volume in assoluto può anche essere relativamente limitata: però una perdita del volume di sangue determina una perdita di una sostanza fortemente necessaria per la sopravvivenza, perchè se c'è meno sangue c'è meno ossigeno e meno nutrimento.

Quindi non è senza ragione che tutti i sistemi che controllano la pressione siano affacciati sul circolo sanguigno arterioso: noi non abbiamo un regolatore, se non una serie di segnali dei volumi complessivi, però abbiamo dei precisi regolatori che sono attivati da variazioni del volume ematico.

Abbiamo centri vasomotori che sono regolati dalla distensione delle grosse arterie.

Abbiamo a lungo termine il rene che è regolato dalle pressioni e dai volume nell'arteriola afferente.

Quindi in realtà abbiamo dei sensori che si affacciano tutti sul circolo sanguigno: se c'è una variazione del volume ematico, la ripercussione sarà immediata, infatti se si ha un'emorragia, la risposta sarà tachicardia e vasocostrizione.

Quindi una perdita di volume ematico determina molto rapidamente un'attivazione del sistema adrenergico che legge ogni perdita di efficacia cardiaca come una perdita di volume; è pertanto indistinguibile l'effetto di una emorragia da quello del passaggio da clino- a ortostatismo: il sangue nel primo caso è perso, nel secondo caso è compartimentalizzato, con il risultato finale che si ha un'attivazione del sistema adrenergico.

Nella perdita di volume può accadere che essa non sia controllabile: se abbiamo un'emorragia e questa prosegue, non è controllata, accade che la pressione necessariamente scende perchè la gittata cardiaca si riduce. C'è una soglia minima di pressioni e di volumi al di sotto dei quali non c'è più capacità di compenso: una perdita di volume di circa il 25%, ed una pressione arteriosa media che scenda intorno a 70 mmHg o poca sopra, in funzione dell'intensità dell'attività adrenergica, determina una condizione di rischio se non corretta immediatamente perchè determina una condizione di ipoperfusione tissutale (la funzione circolatoria viene persa).

Aldilà dell'emorragia, anche una brusca vasodilatazione con aumento della permeabilità vascolare come nello shock anafilattico, determina la stessa situazione: quindi ogni perdita di volume consistente, e qui rientra il concetto di volume efficace cioè il volume che riempie le grosse arterie e che è sentito dal sistema barorecettoriale, determina un'incapacità di adattamento perchè si scende sotto la soglia di possibile autoregolazione e quindi si creano le condizioni di ipoperfusione dei tessuti.

Una cattiva capacità del cuore di spingere in avanti con una perdita di volume, oppure l'incapacità del sistema adrenergico di avere un buon controllo del tono vasomotorio, sono determinanti di variazioni brusche della pressione arteriosa.

C'è da aggiungere un altro aspetto, e cioè che il ritorno venoso è altrettanto importante e quindi la funzionalità dei meccanismi che controllano il ritorno venoso è altrettanto importante per avere un buon controllo del circolo.

Tornando all'esempio di cambio di postura, da distesi a in piedi, quello che accade anche in posizione ortostatica è che viene attivata la cosiddetta "pompa muscolare": questo è ancora più evidente quando si agisce con la pompa muscolare scheletrica nella corsa.

Il tono muscolare è importante come complemento dei meccanismi di controllo del circolo perchè determina un ottimale ritorno venoso, il quale è in parte determinato dall'effetto pompa dell'apertura e chiusura della cassa toracica ma è anche molto determinato dal tono compressivo dall'esterno che si ha sul circolo profondo attraverso il tono muscolare.

La parete venosa, che ha una struttura muscolare molto debole, non sarebbe in grado di controllare in modo adeguato il proprio tono attraverso il meccanismo di vasocostrizione attiva, riesce a mantenere un tono se c'è la pompa muscolare.

Quindi un altro aspetto delle malattie neurodegenerative è che, se voi avete un cattivo controllo del circolo avrete un deficit di forza muscolare, un'atrofia muscolare, voi avete un'ulteriore componente che aggrava la capacità di controllare il ritorno venoso.

L'altra componente è sicuramente l'attività respiratoria perché nella fase di apertura della cassa toracica c'è una depressione maggiore e quindi una riduzione della pressione dall'esterno sui vasi, quindi una vasodilatazione del circolo venoso sistemico nel tratto intratoracico che favorisce, creando un maggiore gradiente di pressione negativo, il riempimento dell'atrio.

Quindi tutte le condizioni di alterata risposta vasomotoria riflessa sono responsabili dell'adattamento posturale e questo può determinare bruschi cali della pressione arteriosa in quelle sindromi come di tipo sincopale "sincopi, presincopi" che sono determinate da ipoflusso cerebrale, secondario alla caduta della pressione arteriosa.

Nelle croniche alterazioni del controllo adrenergico oltre ad avere una maggiore possibilità di avere cadute improvvise della pressione arteriosa, si ha, come elemento caratteristico, un basso livello di pressione arteriosa: questa tende ad essere stabilmente più bassa, tanto più se si è in posizione ortostatica. Insieme a questo c'è un'elevata variabilità pressoria per cui, paradossalmente, negli anziani se si fa un profilo di registrazione della pressione arteriosa, si trovano dei profili diurni e

notturni di pressione che sono esattamente il contrari di quello che avviene in fisiologia nel soggetto sano, cioè alti livelli di giorno legati all'attività fisica, al tono muscolare e alla veglia di per sé, e un basso livello notturno legato al tono vagale maggiore.

Nell'anziano bassa pressione diurna perchè non c'è controllo in ortostatismo, alta pressione notturna perchè c'è un effettivo controllo del rapporto flussi-pressione.

Tutti i vari livelli di regolazione possono essere coinvolti nelle patologie di questo tipo, ci può infatti essere:

-deficit di risposta per alterazione del centro vasomotorio, malattie degenerative cerebrali, malattie ischemiche cerebrali, con storia di insulti cerebrali vascolari;

-deficit della funzionalità cardiaca;

-deficit di controllo del tono vascolare;

-condizioni di alterata risposta cardiovascolare ;

-cattiva regolazione del sistema barorecettoriale in se, che può essere alterato perché il vaso prossimale al cuore è affetto da aterosclerosi per cui viene come isolato il sistema barorecettoriale rispetto allo stimolo cioè (*registrazione disturbata NdR)* una parete vascolare delle grosse arterie che escono dal cuore molto rigida, la trasmissione dell'impulso aldilà del danno del barocettore di per sé e del sistema di trasmissione delle afferenze simpatiche, determina una mancata risposta.

L'arteria carotide calcifica o l'arco dell'aorta calcifica e questo determina di per sé un'incapacità di adattamento.

Un elemento importante è che la capacità di adattamento è funzionale a dei livelli di pressione fisiologici, cioè funziona in un range di pressioni non ampio, ma è quello che si determina nella vita di tutti i giorni.

Un concetto importante è che questo **setting** dei recettori, può variare nelle condizioni di cronica ipertensione: se ho un soggetto che anziché avere 180 su 20 mmHg di pressione, ha 180 su 120 mmHg, il suo sistema di adattamento adrenergico funziona allo stesso modo di quello di un soggetto con la pressione più bassa, però è sensibile alle variazioni in un range più alto.

Quello che si chiama resetting dei barocettori significa che, in presenza di una cronica ipertensione, la risposta adrenergica è modulata per variazioni in un range di pressioni più elevato. Questo è importante perchè se si somministra un farmaco antipertensivo, che è un vasodilatatore che riduce le resistenze vascolari ad un soggetto che ha la pressione elevata, potrebbe accadere che riportare in modo brusco la pressione a dei livelli fisiologici renda impossibile per questo soggetto adattare la propria attività adrenergica alle variazioni di postura e può così andare incontro ad una sincope non perchè i valori assoluti fossero molto bassi, ma perchè il suo sistema barorecettoriale era settato per un livello di pressione più elevato.

Questo è importante anche a fini pratici: se si deve abbassare la pressione, perchè la pressione elevata costituisce un rischio cardiovascolare ed un rischio di incidenti cerebrovascolari molto elevati, opero in modo molto brusco modulando i volumi con l'uso di diuretici oppure modulando il tono vascolare periferico con una dose eccessiva di vasodilatatori, cosa accade? La capacità di regolazione autonomica del tono vascolare viene persa perchè siamo usciti dal range di autoregolazione.

È come se questa pressione, invece di essere 120 mmHg, fosse 70-80 mmHg, quindi il soggetto va incontro ai sintomi e manifestazioni di incapacità di autoregolazione e può andare incontro a sincope.

Quindi l'adattamento barorecettoriale è una risposta fisiologica ad un cronico incremento di pressione che è una condizione patologica di per sé, però è un adattamento funzionale, quindi se voi trattate un soggetto iperteso per alcuni giorni con quello stesso farmaco avendo avuto prudenza nei primi giorni, l'adattamento barorecettoriale fa si che alla fine risponda come se la sua pressione fosse sempre stata più bassa.

Quindi il barocettore risponde adattandosi ai livelli di quel soggetto in questione purchè siano mantenuti per un certo periodo di tempo: questo vuol dire che se agisco in modo meno brusco nell'abbassare la pressione, la tollerabilità in termini circolatori è molto maggiore.

-Come avviene il controllo vasomotorio attraverso l'azione delle catecolamine:vi sono dei recettori nei vasi periferici che sono prevalentemente di tipo alpha, in alcuni distretti vascolari vi sono recettori di tipo beta. Il sistema adrenergico è cooperante con altri sistemi di controllo vasomotorio, principalmente con il sistema dell'angiotensina.

I segnali possono accumularsi e quindi avere un'attività di potenziamento reciproco, quelli dell'angiotensina rispetto a quelli del sistema adrenergico; non solo dell'angiotensina ma tutti i fattori che regolano,modulano la risposta vascolare.

La stimolazione di tipo adrenergico di tipo alpha è una risposta di tipo vasocostrittivo : questa è di gran lunga prevalente nelle arteriole.

A livello renale ci sono dei recettori beta 2 importanti per la secrezione di renina, cioè il controllo

della secrezione di renina (*il professore dice che tratterà l'argomento più avanti NdR*).

A livello cardiaco, nella muscolatura cardiaca, ci sono prevalentemente recettori beta1 che modulano le risposte adrenergiche.

A livello venoso c'è una modesta capacità di venocontrazione più evidente nelle vene di minor calibro e questo è mediato dal recettore di tipo alpha1.

Importantissimo è invece il controllo vasomotorio alpha1 che è il principale meccanismo di controllo vasomotorio a livello delle arteriole di resistenza: se aumenta l'attività adrenergica la risposta complessiva è di tipo vasocostrittivo.

Ci sono alcuni distretti vascolari che hanno una maggiore espressione dei recettori di tipo beta, principalmente a livello muscolare: però se voi date una risposta di tipo adrenergico la risultante netta nel circolo sistemico quindi i parametri sistemici di pressione sono un incremento, perciò una vasocostrizione complessiva.

In certi distretti come il distretto splancnico e quello muscolare per certi aspetti la modulazione è diversa. Nel distretto splancnico ci sono degli adattamenti del tono vascolare che rispondono a molti altri stimoli, compreso lo stimolo di tipo adrenergico con vasodilatazione mediata da recettore di tipo beta2.

Se si dà una forte stimolazione adrenergica, la risposta complessiva, cioè se si misura la pressione a livello delle grosse arterie, la trovate aumentata.

Il sistema simpatico agisce anche sul sistema renina-angiotensina-aldosterone, cioè agisce sul sistema di controllo dei volumi attraverso una compartecipazione nei meccanismi di rilascio di renina. Il sistema renina-angiotensina-aldosterone è il principale regolatore dei volumi in risposta alle variazioni di riempimento vascolare a livello renale e a livello sistemico. La renina è rilasciata dal rene in risposta ad attività adrenergica e in risposta a stimoli che sono analoghi a quelli di tipo barorecettoriale e in risposta soprattutto al rilascio di prostacicline. (*il professore spiegherà più avanti questa parte NdR).*

Il controllo della pressione e il ruolo del rene nel controllare i volumi sono questioni importanti.

Se io ho un eccesso di volume nel circolo, è inevitabile che questo si traduca in un aumento di pressione del circolo arterioso: se aumento il riempimento di un vaso arterioso la pressione è necessariamente più alta.

Se ho un eccesso di volumi circolanti e ho un eccesso di volumi idrici complessivi, la pressione necessariamente aumenta.

Il principale regolatore dei volumi è il rene per cui inevitabilmente c'è una relazione tra la capacità del rene di eliminare acqua e sodio e pressione arteriosa: non voglio andare oltre perché è una relazione di difficile dimostrazione perchè io posso aumentare il contenuto di acqua e di sale e il volume non aumenta più di tanto; però se io ho un difetto renale per il quale io non riesco ad eliminare tutta l'acqua e tutto il sale che entra nell'organismo, inevitabilmente ho un eccesso di volume e di conseguenza avrò un eccesso di pressione; avendo un eccesso di pressione il rene riesce ad eliminare l'acqua e il sodio in eccesso.

La risposta all'incremento di pressione corregge quindi il difetto: ci sono molte condizioni, dall'insufficienza renale alle condizioni di iperaldosteronismo, cioè un eccesso di produzione di aldosterone, nelle quali l'aumento di volume circolante dovuto ad un eccesso di acqua e di sodio, porta ad una normale escrezione di acqua e di sodio in presenza di elevati valori di pressione; incrementando la pressione si riequilibra il sistema.

Questo concetto è molto importante perchè buona parte degli stati di ipertensione arteriosa sono determinati da un meccanismo di questo tipo: un relativo eccesso di pressione cronico nel tempo determina un incremento di pressione e questo è in grado di correggere il difetto, per cui la quantità di acqua e di sodio ritorna all'equilibrio proprio perchè la pressione è salita e il rene filtra di più e quindi si può eliminare di più.

AUTOREGOLAZIONE LOCALE DEI FLUSSI

A livello del microcircolo siamo arrivati con un flusso ed una pressione costanti, questo perchè le arteriole di resistenza, diminuendo il calibro del vaso, necessariamente riducono la pressione a valle e riducono l'ampiezza della differenza sistole-diastolica. Siamo arrivati ad una condizione in cui si rende il flusso e la pressione costanti, condizioni queste ottimali per gli scambi a livello capillare.

Se la condizione è di questo tipo, è poco probabile che si possa agire regolando i flussi attraverso un meccanismo di vasocostrizione che determini un'ulteriore riduzione del flusso.

Quello che accade è che più che determinare un tono vasocostrittore nel circolo capillare, si adopera un sistema di reclutamento-esclusione. Dove c'è una vasocostrizione, il circolo viene interrotto; dove c'è una vasodilatazione (un tono adrenergico minore o meccanismi di controllo più spinti verso la vasodilatazione) si ha un maggiore reclutamento dei capillari.

Quindi più che modulare le pressioni, si modulano i flussi attraverso un gioco di esclusione-reclutamento.

Quando si corre la cute diventa rossa, viene più nutrita, perchè? C'è un maggior reclutamento dei capillari ed una vasodilatazione che agisce non tanto in modo lineare su tutto il vaso, ma a livello degli sfinteri precapillari; nel caso della corsa una vasodilatazione massiva, per cui tutti i capillari sono reclutati: il tessuto è maggiormente nutrito ed ossigenato, i flussi distrettuali aumentano enormemente.

Si ha una vasocostrizione di tipo adrenergico a livello del circolo arteriolare, a livello del circolo precapillare avviene un'esclusione del circolo capillare in quel distretto: questo è importante perchè regola i flussi distrettuali

REGOLAZIONE DEI FLUSSI DISTRETTUALI

Se si fa un pasto abbondante, il sangue servirà a livello gastro-intestinale perchè c'è il circolo capillare intestinale che deve aumentare i suoi flussi: il circolo del tratto gastroenterico è fortemente regolato da ormoni e sostanze vasoattive prodotte localmente.

Se si corre dopo un pasto molto abbondante ci sarà bisogno di rifornire il muscolo scheletrico di sangue: si creerà una competizione perchè avendo mangiato molto, il sangue che era andato nel distretto mesenterico, è stato dirottato lì attraverso il gioco i vasocostrizione a livello del circolo pre-capillare quindi esclusione di capillari nel circolo cutaneo e muscolare.

Se si comincia a correre una parte del flusso sanguigno che era andato nel circolo mesenterico viene deviato attraverso una vasodilatazione locale sul circolo muscolare scheletrico.

Quale sarà il risultato? Si correrà male ma si avranno anche dolori addominali, difficoltà digestive perchè si ha una deviazione del flusso verso altri distretto.

Quindi il meccanismo di regolazione arteriolare, ma soprattutto quello a livello più periferico degli sfinteri pre-capillari, serve per modulare i flussi distrettuali.

I flussi distrettuali sono differentemente regolati nei diversi distretti corporei: negli arti le variazioni di flusso possono essere estremamente ampie *-se si è a riposo il flusso è 1, se si inzia a correre il flusso diventa 10, può aumentare anche di più, fino a 20, perchè c'è un aumento della gittata cardiaca e c'è una vasodilatazione locale* – la quantità di sangue in circolo non è aumentata, quindi il sangue che va in quel distretto muscolare viene sottratto ad altri circoli, dove vengono attuati dei meccanismi di esclusione.

Ci sono però degli organi che devono essere protetti da tutto questo, perchè se correndo tutto il sangue andasse al muscolo e non al cervello, si cadrebbe subito.

La stessa cosa quando si mangia, perchè il sangue deve arrivare anche al rene e non solo al tratto gastroenterico.

Se si fa uno sforzo fisico, il sangue non deve andare solo al muscolo cardiaco ma anche al muscolo scheletrico.

Ci sono quindi alcuni organi che devono avere una sorta di protezione in modo da avere flussi e pressioni nel microcircolo il più costanti possibile.

Si parla quindi di **meccanismi di autoregolazione dei flussi distrettuali:** possono essere bassi, poco attivi in alcuni distretti, nel muscolo scheletrico ad esempio, e devono invece essere estremamente efficienti in altri distretti, primo fra tutti l'encefalo; questo perchè le necessità metaboliche dell'encefalo sono costanti, sotto sforzo psichico possono aumentare, quindi deve esserci un apporto sanguigno e di ossigeno che deve essere il più stabile possibile.

Quindi oltre ai meccanismi adrenergici, devono entrare in gioco dei meccanismi che autoregolino localmente i flussi: lo fanno attraverso l'azione sulle arteriole di resistenza, ma lo fanno molto anche attraverso la regolazione dei sistemi di esclusione-reclutamento del circolo capillare.

Come può autoregolare il circolo? Il concetto di base è che l'attività adrenergica, la modulazione dei recettori, la distribuzione dei recettori per cui alcuni distretti in risposta ad uno stimolo adrenergico possono dilatare (circolo splacnico), altri vasocostringere, dà una modulazione abbastanza grossolana nel senso che la risposta adrenergica è una risposta integrata che riguarda tutto il circolo, e non può distinguere un distretto vascolare da un altro.

È quindi inevitabile che l'autoregolazione sia un meccanismo di controllo molto locale: lo stesso vaso è in grado di autoregolare il proprio tono in quello specifico distretto.

Ruolo dell'endotelio nella regolazione del flusso e capacità intrinseche di autoregolazione della muscolatura: se ci sono condizioni di alterato flusso, per esempio nell'interruzione del circolo, si generano localmente dei fattori che possono generare una vasodilatazione. Se si mette un laccio, interrompendo la circolazione sanguigna come si fa quando c'è un'emorragia, e nel frattempo viene ricucito il vaso arterioso e viene ripristinato il circolo, si avrà poi una massiva vasodilatazione.

La prima interpretazione di questo fenomeno, interpretazione ancora valida, è che localmente vengono rilasciati dei fattori che sono in grado di dare vasodilatazione, perchè quest'ultima riguarda solo il distretto che era rimasto ischemico, quindi non è un fatto sistemico, per cui non c'entra l'attività cardiaca, ma è un'attività di regolazione locale.

I fattori che sono stati chiamati in causa sono fattori che venivano rilasciati in risposta all'ipossia: potassio, acido lattico, adenosina e queste sostanze sono effettivamente dei potenti vasodilatatori; il potassio è stato di recente classificato come uno dei fattori vasodilatanti locali.

L'ipossia stessa con calo di O_2 dà anche accumulo di CO_2 che è un vasodilatatore.

La prima spiegazione è stata questa: gravi perturbazioni del flusso, arresto del circolo, determinano localmente il rilascio di sostanze vasodilatatrici, aspecifiche per certi aspetti.

Nella **flogosi** inoltre, si rilasciano della sostanze che sono dei potenti vasodilatatori. Oltre all'effetto iperemizzante della flogosi, che può essere sistemico e importantissimo nel regolare i flussi in caso di sepsi, ci può essere anche un ruolo di queste sostanze a concentrazioni più basse nella regolazione fisiologica o fisiopatologica in altre condizioni.
ISTAMINA,CHININE,PROSTAGLANDINE, SEROTONINA, sono tutte sostanze che possono influire sulla regolazione del tono nell'ambito del processo flogistico. L'esempio più importante è lo stato settico: nella sepsi si può determinare una potente vasodilatazione, un controllo vasomotorio potentemente alterato che determina lo SHOCK SETTICO.

Ci sono altri fattori prodotti localmente da leucociti ed endotelio che determinano vadodilatazione.

Ci sono però altri meccanismi che intervengono in condizioni fisiologiche: il passaggio da una posizione di riposo ad un esercizio fisico, determina una vasodilatazione che non è determinata da elevatissime alterazioni dei composti che abbiamo visto fino adesso; ci deve essere qualche altro meccanismo che agisce in modo più fisiologico, nell'ambito della regolazione fisiologica del tono vascolare.

Qui ha avuto un ruolo fondamentale l'identificazione del ruolo dell'endotelio come regolatore funzionale e fisiologico del tono vascolare: non solo funzionale ma anche nel regolare la struttura della parete vascolare; sono stati identificati una serie di composti prodotti dalla parete vascolare ma prodotti soprattutto dalle cellule endoteliali che sono in grado localmente di determinare la variazione di flusso e quindi anche di pressione.

Esempio: se si lega un bracciale, aumenta la pressione, interrompo il circolo sanguigno determinando un arresto del flusso arterioso: dopo alcuni minuti massimo 10, rilasciando il manicotto si ha poi una vasodilatazione locale; però si è visto che nelle arterie che portano sangue a quel distretto, anche c'è vasodilatazione.

Se sono prodotti locali,il ritorno nel circolo sistemico è nel circolo venoso, non possono risalire controcorrente nel circolo arterioso: quindi la vasodilatazione a monte non è spiegabile con il rilascio di prodotti locali, perchè questo avrebbe un effetto sistemico; una grave ipossia determina una vasodilatazione generalizzata perché dappertutto sono prodotti, ma comunque anche se fosse locale, il circolo è quello venoso quindi la distribuzione è sistemica .

Per avere una vasodilatazione del circolo che porta sangue all'arto, vuol dire che localmente sono rilasciate altre sostanze che non risentono dell'ischemia ma risentono delle variazioni del flusso.

Se voi correte e aveste una vasodilatazione, questa è istantanea e precede per certi aspetti anche la risposta adrenergica la variazione del tono adrenergico ma comunque il tono adrenergico non spiega la vasodilatazione locale nell'esercizio fisico.

Ciò significa che il vaso deve essere in grado di rilasciare delle sostanze che determinano una vasodilatazione massiva.

Se io prendo una preparazione di un vaso e con un batuffolo di cotone gratto l'interno del vaso portando via l'endotelio, in risposta a certi stimoli come la trazione oppure l'aggiunta di sostanze vasoattive come la serotonina,l'acetilcolina o tante altre, come l'adrenalina: se ho l'endotelio, ho una risposta vasodilatante in una preparazione isolata; se tolgo l'endotelio ho una potente vasocostrizione.

Questo vuol dire che l'endotelio era responsabile del tono vasodilatante.

-*Ma attraverso che cosa?* Essenzialmente attraverso due sostanze : una è l'**ossido nitrico**, il principale regolatore del tono vascolare.

Quindi la regolazione del tono vascolare arterioso è mediata principalmente dall'endotelio, che in risposta a stress di parete, in risposta ad una stimolazione adrenergica o ad altri stimoli, mette in atto una vasodilatazione .

Siccome, ad esempio nell'esercizio fisico, è lo stress di parete che aumenta il flusso perchè è aumentata la gittata cardiaca e perchè sono aumentati anche dei segnali periferici, si determina una vasodilatazione locale che permette l'adattamento anche nelle arterie a monte rispetto al tessuto a valle. Quindi l'adattamento vascolare è istantaneo.

La **prostaciclina**, un derivato dell'acido arachidonico, è anche un potente vasodilatatore però sembra che contribuisca meno al tono vasodilatante, il quale è determinato in tutto il sistema circolatorio principalmente dall'ossido nitrico.

Lezione di Patologia generale e fisiopatologia clinica (sem2) del 4/3/2013 (1)

Prof. Cassatella

04/03/2013

Sbobinatore: Bortolato Agnese

Revisore: Kadrija Dzenete

RECETTORI PER PAMP ENDOSOMIALI

Il TLR4

Un recettore importantissimo che lega il lipopolisaccaride è il **TLR4**.

IL TLR4, da una parte si comporta esattamente come i TLRs di membrana che legano il **MyD88** e induce quindi più o meno le stesse risposte; dall'altra parte il TLR4 in maniera separata (?) all'attivazione della via MyD88-dependent: migra negli endosomi e all'interno di questi aggancia **TRIF**, grazie al fatto che il TLR4 è attaccato a una proteina adattatrice che si chiama **TRAM**. A partire dagli endosomi il TLR4 da una parte potenzia l'attivazione di **NFKB**, dall'altra parte va a indurre l'espressione degli **interferoni di tipo I**, soprattutto all'inizio l'interferone beta. Gli interferoni di tipo I sono costituiti dall' IFNalfa e l'IFNbeta. Sono due interferoni che praticamente hanno la stesse azioni biologiche in quanto legano entrambi lo stesso complesso recettoriale, che si trova espresso su quasi tutte le cellule. L' attivazione dell'espressione dell'IFNbeta è dovuta all'attivazione della via MyD88-dependent o della via TRIF-dependent , che è questa proteina adattatrice. Questa via è in grado di segnalare attraverso il reclutamento e l'attivazione delle chinasi che sono specializzate nel fosforilare i fattori di trascrizione che appartengono alla famiglia delle IRF3 espresse per esempio nei macrofagi e nelle cellule dendritiche, conventional dendritic cells.

TLR3

Poi ci sono i TLRs endosomiali, che si trovano nel reticolo endoplasmatico e quando devono essere attivati migrano e si localizzano negli endosomi, dove si attivano. Si dividono in diversi tipi a

seconda della localizzazione cellulare. Il **TLR3** riconosce l'RNA a doppia elica e, da una parte va ad attivare NFKB, dall'altra attiva IFNbeta, perché utilizza TRIF come proteina adattatrice e quindi in pratica utilizza le stesse vie di trasduzione del TLR4 endosomiale. Quindi attiva le citochine pro-infiammatorie, tra le quali interferon nelle fasi iniziali; dopo che è prodotto e rilasciato, l' interferone va a sua volta a stimolare soprattutto le cellule vicine o la cellula che l'ha rilasciata, per indurre un programma di attivazione specifico di geni, per cui oggi si parla di **"interferon signature"**. È proprio un programma che porta all'attivazione di una serie di geni che sono molto specifici dell' l'INF di tipo I, quindi facilmente riconoscibili. Infatti quando oggi si fanno gli studi di espressione genica nelle varie cellule è possibile categorizzare le modificazioni della regolazione genica nelle cellule e quindi risalire a quale può essere lo stimolo che le ha indotte. Infatti ci sono molte patologie autoimmuni dove si trova questo interferon signature.

TLR7, TLR8, TLR9

Altri TLRs endosomiali sono il TLR7, il TLR8, che si comportano nella stessa maniera e il TLR9. Essi sono espressi differenzialmente in tipi cellulari diversi: TLR7 e TLR9 sono particolarmente espressi nelle cellule plasmacitoidi, ma anche nei linfociti B. Il TLR7 e il TLR8 riconoscono l'RNA a singola elica, il TLR9 invece il DNA non metilato ricco di isole CpG. Questi recettori segnalano sempre attraverso MyD88: in questo caso MyD88 attiva una via di trasduzione che porta all' induzione da una parte delle citochine pro infiammatorie, dall'altra parte degli interferoni di tipo I, in questo caso IFNalfa. Quindi mentre TLR4 e TLR3 inducono la produzione di IFNbeta, nelle plasmacitoidi TLR7 invece induce la produzione di IFNalfa, perlomeno all'inizio, poichè è implicato in questa via **IRF7**, anzichè IRF3. Infatti nel caso della via di trasduzione indotta da TLR7, MyD88 porta alla fosforilazione di IRF7. Poi gli stessi interferoni, una volta prodotti, vanno ad aumentare l'espressione delle proteine che compongono questa via di trasduzione e nel tempo amplificano la produzione di degli interferoni stessi.

RECETTORI CITOPLASMATICI PER RNA

Tra i sistemi di riconoscimento dei PAMP citoplasmatici abbiamo i recettori che riconoscono gli RNA citoplasmatici di origine virale; essi sono fondamentalmente costituiti dai membri delle **famiglie RIG-I like**, cioè **MDA5** e **RIG-I**. RIG-I è il prototipo di questi recettori che riconoscono l'RNA a doppia elica di origine virale. Ciascuno di questi due recettori è specializzato nel riconoscere soprattutto l'RNA estraneo, perché è un po' modificato rispetto all'RNA dell'ospite. Presenta delle alterazioni, delle aggiunte di vari gruppi ecc… Per esempio l'MDA5 riconosce l'RNA 5' trifosfato; nei mammiferi questa modificazione non esiste (controllare). Così come l'MDA5 riconosce il siRNA, un RNA sintetico che si usa in laboratorio e nei modelli animali per mimare l'azione dell'RNA a doppia elica virale.

Questi recettori citoplasmatici che riconoscono gli acidi nucleici virali ovviamente devono attivare un segnale che porta alla produzione di interferoni. Le cellule dell'immunità innata infatti si avvalgono di una serie di meccanismi di difesa innescati proprio l'azione degli interferoni di tipo I, beta e alfa. Negli ultimi anni sono anche stati scoperti **interferoni di tipo III**, o lambda, che hanno un'azione molto simile agli interferoni di tipo I, anche se l'azione è più selettiva perché solo alcune cellule hanno i recettori per gli IFNIII o lambda .

Questi recettori attivano la via di trasduzione che è molto simile alla via TRIF dipendente in quanto MDA5e RIG-I comunque portano all'attivazione del sistema **TBK1 e KKepsilon**. Poi TDK1 va a fosforilare **IRF3** e nel caso di questa via di trasduzione fondamentale ancora una volta è una proteina adattatrice che si chiama IPS1 o MABS che si trova legata a livello dei mitocondri. Per cui quando questi recettori si attivano si forma un complesso cosiddetto **signalosoma** che parte dai

mitocondri e attiva tutta la cascata che porta alla produzione dell'interferone. RIG-I e MDA5 attraverso IPS1 attivano questa cascata. Ancora una volta portano all'attivazione sia di IRF3 e anche del sistema di NFKB che viene sempre attivato come nelle altre vie e quindi si ha un'induzione dell'interferone di tipo I e di delle citochine pro-infiammatorie. Qua vedete *(slide)* alcuni esempi di come si difendono i virus, tipo l'influenza virus, l'HCV (virus dell'epatite C), il paramixovirus, che esprimono delle proteine che possono interferire con l'azione o col segnale di trasduzione attivati da questi recettori. L'RS3 e l'RS4 sono ad esempio delle proteasi che vanno a degradare il PS1 o anche il TDK1 o IRF3: quindi bloccando i messaggeri, il segnale viene bloccato. Infatti è spesso studiando la patogenesi delle malattie infettive che si capisce come funzionano le risposte. La tabella *(slide)* mostra una serie di regolatori e inibitori, che possono essere indotti da citochine o altri sistemi.

RECETTORI CITOPLASMATICI PER DNA

Per concludere l'argomento dei recettori per gli acidi nucleici, dobbiamo parlare dei recettori che riconoscono i **DNA citoplasmatici**, che ancora una volta provengono da virus o da batteri e altri microorganismi. Quindi esistono anche tutta una serie di recettori nel citoplasma capaci si riconoscere il DNA estraneo, poiché nel citoplasma il DNA endogeno normalmente non esiste. Questo campo è molto fluttuante perché continuano regolarmente ad essere scoperti nuovi recettori. Questa tabella è abbastanza aggiornata: contiene una lista di alcuni recettori, alcune proteine citoplasmatiche che possono fungere da sensori del DNA citoplasmatico *(vedi slide n.5).*La prima che è stata scoperta è **DAI** e anche se attualmente il ruolo non è ben definito: si è visto che nei topi knock-out non si verificano grosse alterazioni. Altri di questi recettori sono **l'RNA pol III**, la proteina **LRRFIP1**, le **proteine DHX** che rientrano nel gruppo delle elicasi**, IFI16**, che è un gene indotto dagli interferoni (da alcune cellule è prodotto costitutivamente, ma gli IFN ne aumentano l'espressione) e **KU70**. Nella tabella sono mostrati anche alcuni patogeni a DNA che sono riconosciuti da questi recettori.

Come si comportano questi recettori? Le risposte che si ottengono in seguito al riconoscimento del DNA citosolico sono due. Una è analoga a quella dei recettori che riconoscono l'RNA: la risposta consiste nell'attivazione **di TBK1 e KKepsilon** e KKI, che portano ancora una volta alla fosforilazione di **IRF3 e di IRF7**, a seconda del tipo cellulare, i quali sono poi responsabili della produzione dell'INF di tipo I. TDK1 e KKepsilon, che sono le due chinasi che svolgono la stessa azione ma funzionano nei diversi tipi di cellula nel tempo (prima funziona TDK1, poi successivamente KKepsilon). Questo modulo (TBK1 - KKepsilon e IRF3 - IRF7) su cui convergono i signalling di questi recettori deve indurre INF tipo I. Questo è un modulo essenziale, anche se poi ovviamente intervengono altre cascate di tasduzione che portano all'attivazione di altri fattori di trascrizione che si trovano nel promotore degli interferoni (uno di questi è NFKB). Il fatto essenziale è questa cascata TBK1 e IRF3/IRF7.

Nel caso di questi recettori che attivano interferoni I e NFKB, la cascata di trasduzione prevede il coinvolgimento di un'altra proteina adattatrice che si chiama **STING**. Essa è localizzata nel reticolo endoplasmico ed è fondamentale perché ancora una volta su di essa convergono i signalling di questi recettori che riconoscono il DNA e che portano all'attivazione dell'interferone di tipo I. Il DNA viene riconosciuto nudo, oppure complessato e trasportato da altre proteine; viene riconosciuto da un sensore citosolico il quale poi si complessa con STING; STING poi a sua volta forma il signalosoma che attiva la classe di TBK1, IRF3 o IRF7 portando alla trascrizione degli interferon. Questo è il meccanismo generale.

La RNA polimerasi di tipo III

È stata scoperta un’altra modalità interessante che coinvolge RIG-I. E’ stato visto che il DNA citosolico in certe situazioni può essere trascritto in RNA da una RNA polimerasi di tipo III. In questo caso, il recettore che riconosce il DNA citoplasmatico è la RNApol III che va a **trascrivere il DNA in RNA a doppia elica**. Questo dsRNA viene riconosciuto da **RIG-I**, che quindi attiva la cascata che abbiamo visto precedentemente. Quindi si tratta di un riconoscimento indiretto da parte di RIG-I grazie all’azione della RNApol III, che trasforma il DNA in RNA a doppia elica.

Questa diapositiva aggiornatissima descrive una lista di recettori fino ad oggi riconosciuti capaci di riconoscere il DNA citoplasmatico. Ad esempio alcune elicasi, poi le proteine DHX9 che riconoscono le sequenze degli Herpes simplex e di altri virus, IFI16, DAI. Ad ogni modo tutti alla fine vanno ad attivare IRF3 o IRF7 o complessi di IRF3 e IRF7, che a loro volta vanno ad attivare la trascrizione degli interferoni di tipo I; tranne il recentemente scoperto Q70 che invece è più specializzato a far partire la trascrizione di IL28 (IFN lambda1).

L’INLAMMOSOMA

Poi c’è un’altra via scoperta più recentemente scoperta e implica i recettori citosolici che riconoscono il DNA e che sono capaci di andare a formare un complesso citoplasmatico che si chiama **inflammosoma**, che verrà descritto in seguito. Questo complesso citoplasmatico, l’inflammosoma, (che in realtà si riferisce a una serie di complessi citoplasmatici, che riconoscono in maniera specifica PAMP diversi) è responsabile della attivazione della **caspasi1**, che normalmente si trova allo stato inattivo, in forma di **pro-caspasi**. Questa caspasi1, attivata dalla formazione dell’inflammosoma, è in grado di andare a degradare altre proteine che si possono trovare in forma inattiva nel citoplasma, rappresentate dalla **pro-IL1beta** e dalla **pro-IL18**. Quindi la caspasi1, che è un enzima proteolitico, degrada il precursore di IL1beta e IL18, determina la formazione della proteina biologicamente attiva che viene secreta. Quindi questo inflammosoma è responsabile dell’attivazione della pro-IL1beta che deve essere degradata per essere rilasciata. IL1beta è importantissima per la risposta infiammatoria.

RECETTORI PER DNA E INFLAMMOSOMA

Recentemente sono stati caratterizzati alcuni recettori che riconoscono il DNA capaci di fungere da proteina che può far parte dell’inflammosoma. Uno di questi si chiama **AIM2**, un altro più recente è **NLRP3**. Nel caso in cui ci sia riconoscimento nel citoplasma di DNA da AIM2, questo si attiva e forma il complesso dell’inflammosoma, il quale determina la trasformazione della pro-caspasi in caspasi attiva, che va a clivare la pro-IL1beta, trasformandola in molecola attiva che viene rilasciata. NLP3 si comporta in maniera analoga, ma riconosce DNA di altra origine. C’è anche **IFI16** che può da una parte attivare la via di TBK1 e IRF3 e quindi attivare gli interferon, dall’altra parte è stato scoperto recentemente che (solo in alcune cellule e solo a localizzazione nucleare) può riconoscere il DNA che deriva dal virus del sarcoma di Kaposi e attivare la caspasi1.

CELLULE PLASMACITOIDI, DENDRITICHE CONVENZIONALI E RECETTORI PER PAMP

Questa rappresentazione *(slide)* schematizza i meccanismi di riconoscimento utilizzati dalle cellule dendritiche conventional rispetto alle cellule plasmacitoidi. Le **cellule plasmacitoidi** sono molto più potenti nella loro capacità di produrre **interferone alfa**, rispetto alle cellule dendritiche convenzionali: producono interferone di tipo I in quantità elevatissime, molto più di qualsiasi altra cellula. Le **cellule dendritiche** invece a loro volta sono capaci di produrre citochine in grandissima quantità. Però nel caso delle cellule plasmacitoidi, il corredo recettoriale che queste cellule esprimono per rispondere ai PAMP è inferiore rispetto alle cellule dendritiche convenzionali.

Le dendritiche plasmacitoidi hanno TRL7 e TRL9, alcune elicasi che riconoscono il DNA e che portano all'attivazione soprattutto di IRF7, che è il fattore di trascrizione fondamentale soprattutto per la produzione dell'interferon alfa. Le cellule convenzionali invece sono in grado di esprimere altri recettori, come TLR3 RIG-I e MDA5 e altri recettori che riconoscono il DNA.

Questa tabella (*vedi slide*) riassume tutti i vari tipi di PAMP capaci di indurre interferone di tipo I (RNA a doppia e singola elica, DNA citoplasmatico ecc..), quali sono i recettori quali sono le cellule che maggiormente rispondono.

LA VIA DI NFKB

Gli stesso recettori che riconoscono il DNA sono anche in grado di attivare il sistema di NFKB: attivano una serie di chinasi che vanno a fosforilare la proteina che mantiene inattivo il complesso nel citoplasma (**iKB**), diversa in diversi tipi di cellula; questa proteina fosforilata si distacca dal complesso e viene poi degradata. NFKB è quindi in grado di migrare nel nucleo, dove si lega a sequenze specifiche che vano ad attivare la trascrizione di **citochine infiammatorie** (per esempio la **pro-IL1beta**, la **proIL18**, che poi necessitano dell'attivazione dell'inflammosoma per essere secrete).

NOD-LIKE RECEPTORS

Ci sono altri recettori citoplasmatici che riconoscono componenti batteriche diverse dagli acidi nucleici: i NOD-like-receptors (**NLRs**). Questi funzionano secondo gli schemi visti precedentemente. Sono localizzati nel citosol e sono molto numerosi (e continuano ad aumentare). Riconoscono cell bacterial wall, lipidi e altri **PAMP batterici**. Prototipi di questa famiglia di proteine sono **NOD1 e NOD2**. È possibile riconoscere a livello strutturale dei domini noti, che li caratterizzano e danno loro specificità, e altri domini che spiegano la loro funzione e come interagiscono con altri componenti della cascata di trasduzione. Il **dominio NOD** è fondamentale, inoltre vi è il dominio LRR che si ritrova anche nei TLRs e il dominio CARD che è presente ad esempio anche nell'elicasi. I domini CARD favoriscono l'interazione con altre proteine che anche esse presentano domini CARD.

NOD1 E NOD2

NOD1 e NOD2 sono quindi proteine citoplasmatiche capaci di riconoscere PAMP batterici e non solo; in seguito al riconoscimento vengono attivati NFKB e il sistema delle MAP chinasi, attivando perciò la trascrizione di mediatori pro-infiammatori. NOD1 e NOD2 riconoscono componenti del peptidoglicano: nello specifico NOD2 riconosce l'acido **N muramil- dipeptide**, e NOD1 **l'acido diaminopimelico**. Il peptidoglicano è un polimero composto da derivati polisaccaridici (N-acetil-glicosamina, acido N-muramico legati tra loro da legami peptidici). Dato che il peptidoglicano si trova nei batteri, NOD2 funge da sensore generale per la maggior parte dei batteri; invece l'acido diaminopimelico è presente solo nei batteri gram positivi e quindi NOD1 non è in grado di riconoscere i batteri gram negativi. Questa è una tabella *(vedi slide 20)* degli agenti patogeni da cui derivano i PAMP che vengono riconosciuti da NOD1 e NOD2 (lysteria, shigella, pseudomonas, clamidia, campilobacter jejuni, helicobacter pilori) poi c'è l'MDP (streptococcus, micobacterium, salmonella, stafilococcus aureus ecc).

Il signalling attivato da NOD1 e NOD2 è molto simile e speculare a quello attivato dai TLRs di membrana che utilizzano MyD88. Il signalling va ad attivare **NFKB** e membri delle varie **MAPchinasi** (JNK; ERK; P38….). La combinazione della attivazione di queste chinasi porta alla

fosforilazione di fattori di trascrizione bersaglio, che attivano l'espressione di mediatori pro-infiammatori.

RUOLO DI NOD1 E NOD2 NELL'OMEOSTASI INTESTINALE

Queste proteine NOD1 e NOD2 sono molto importanti nell'omeostasi dell'intestino e nella risposta immunitaria intestinale. *Crf slide 22* Ad esempio NOD2 è espresso nelle cellule di Panneth e dirige la secrezione di peptidi anti microbici, come per esempio le **defensine beta**, che modulano la composizione della flora intestinale. Quando NOD2 è attivato induce il rilascio delle alfa-defensine che sono dei peptidi che vanno a uccidere determinati batteri. Oppure porta alla stimolazione delle cellule dendritiche 103+. Nell'intestino ci sono tutta una serie di sottopopolazioni di cellule mieloidi, comprese le cellule dendritiche, che migrano, si specializzano e acquisiscono marcatori specifici che permettono di identificarle. Quindi la stimolazione degli epiteli intestinali con ligandi NOD2, induce la produzione di **IL10** che promuove la formazione delle cellule T regolatorie. NOD1 invece stimola **CCL20**, che è critica per lo sviluppo dei follicoli intestinali. Se le risposte sono prolungate si possono originare anche i cosiddetti **follicoli linfoidi terziari**, che ovviamente necessitano anche di chemochine e altre cellule per determinare la loro struttura. CCL20 corrisponde a MIP3alfa che per esempio recluta le cellule dendritiche, oltre che i linfociti. NOD 2 è anche importante per il **mantenimento della barriera epiteliale**: se è compromessa favorisce la traslocazione di batteri patogeni. È importante poi per la formazione delle placche di Peyer. Questi recettori sono inoltre importanti per la **produzione precoce di IL6**, citochina importante per la formazione dei Th17, i quali attivati sono responsabili di risposte immunitarie specifiche. Polimorfismi nei geni NOD1 e NOD2 sono implicati nella patogenesi di malattie intestinali croniche, alcune delle quali molto gravi e debilitanti, come la malattia di Chron, la colite ulcerosa, la cui patogenesi è ancora sconosciuta. Sono malattie immunitarie specifiche, caratterizzate da infiammazioni croniche.

LA FAMIGLIA DEI NLRs

Le proteine NOD sono in realtà capostipiti di una famiglia di recettori citoplasmatici molto numerosa: i NOD-like receptors. Alcuni sono elencati in questa figura: NOD1 NOD2 e altri. Sono poi elencati i potenziali agonisti *(vedi slide n. 24).* Si ritrovano anche negli invertebrati, nelle piante e questo ci dice che sono fondamentali dal punto di vista evolutivo per le risposte contro gli agenti microbici. La famiglia dei NLR è suddivisa in in 4 o 5 sottofamiglie: **NLR-A, B, C, P e X**. La classificazione è sulla base del funzione e soprattutto della struttura, legata alla presenza di vari domini *(slide n.26 e 27).*

L'INFLAMMOSOMA

Lo studio delle proteine NLR ha portato alla scoperta dell' inflammosoma, complesso multiproteico che si forma in una cellula quando un recettore per PAMP e non solo riconosce il proprio ligando, in modo da determinare l'attivazione della caspasi1, responsabile della maturazione dell'IL1beta e dell'IL18, che possono così esssere rilasciate. Infatti si è visto che alcuni membri della famiglia NLR sono in grado di attivare la caspasi 1 oltre che l'NFKB.

Gli inflammosomi sono tanti: si parla di inflammosoma ma in realtà ve ne sono diversi tipi, ognuno dei quali contiene all' interno del proprio complesso un recettore citoplasmatico specifico per un determinato PAMP. Mentre inizialmente si pensava che solo i recettori **NLRs** facessero parte dell'inflammosoma, ora si è scoperto che possono concorrere anche **recettori per DNA** come AIM2 e IFI16. Esempio:NLRP3 si trova nel citoplasma in forma dissociata; altri componenti di questo inflammosoma sono per esempio **ASC, Cardinal** che permettono l'interazione con la **pro-**

caspasi1. Quando vene riconosciuto un ligando da parte di un recettore citoplasmatico, si forma il complesso: in questo caso si parla dell'inflammosoma-NLRP3. Questo inflammosoma è in grado di degradare il precursore della caspasi1, determinando la formazione della caspasi1 attiva, la quale va a tagliare la **pro- IL1beta**. La pro-IL1beta si trova nella cellula perché c'è stato precedentemente un segnale che ne ha indotto la trascrizione, ad esempio come risposta all'attivazione di un TLR che ha attivato NFKB, che ha indotto a sua volta la trascrizione del gene della IL1beta. Altro esempio: il recettore NALP3 inattivo si trova in forma ripiegata; il legame con il ligando porta alla conformazione aperta di NALP3, che, attivato, interagisce con ASC e con Cardinal: si forma l'inflammosoma. Questo andrà ad attivare la caspasi1, che cliva la pro-IL1beta,dando origine alla forma attiva che può essere rilasciata.

Sono presenti dei regolatori fisiologici che inibiscono questa cascata, ma anche proteine di origine patogena che vanno a bloccare e a interferire con il meccanismo dell'inflammosoma *(slide 30).*

IL1beta

L'importanza dell'inflammosoma è dovuta al fatto che esso è responsabile del rilascio dell'IL1beta. L'IL1beta è una citochina pro-infiammatoria fondamentale: assieme al TNF è la citochina infiammatoria per antonomasia, in quanto innesca e orchestra i vari fenomeni della risposta infiammatoria, acuta e cronica. È quindi responsabile dell'attivazione della cascata infiammatoria ed ha effetto su cellule e tessuti, assieme ad altre citochine. È importantissima per bloccare per esempio la diffusione degli agenti patogeni. TNF e IL1beta sono talmente importanti che l'ospite dispone di tutta una serie di meccanismi di regolazione della sintesi, della secrezione e degli effetti biologici affinchè l'azione di queste due citochine sia controllata al massimo perché, se ciò non avviene, si ha la comparsa di tutta una serie di patologie infiammatorie croniche. Oggi ci sono le possibilità di bloccare l'azione di queste due molecole. L'IL1beta fa parte di una grossa famiglia: le **interleuchine1**. Fino a qualche anno fa si conoscevano la IL1alfa, la IL1beta e.. Poi ne sono state scoperte delle altre come la IL18, la IL33, ed altre di cui l'azione biologica non è ben nota *(slide 34).* L'IL1beta è quindi la citochina infiammatoria più importante.

Quali sono le sue azioni? *(slide 35)* Viene **prodotta dalle cellule mieloidi** (granulociti, neutrofili, cellule dendritiche). Può agire a livello dell'endotelio attivandolo, inducendo l'aumento dell'espressione delle molecole di adesione: per esempio favorisce l'espressione delle **selectine** che sono importanti per il rolling, ma soprattutto fa aumentare i **ligandi delle integrine** in maniera sfasata nel tempo, fondamentali per l'adesione ferma. Perciò l'IL1beta favorisce la migrazione dei leucociti perchè induce l'espressione delle molecole di adesione, in modo che i leucociti capiscano che in quel determinato tessuto c'è bisogno di loro. Un'altra funzione dell'IL1beta è quella di favorire la **produzione di IL6,** la quale a sua volta agisce a livello epatico stimolando la sintesi delle **proteine di fase acuta**. Agisce anche a livello del midollo modulando la **maturazione dei leucociti**, in particolare favorendo la produzione di granulociti neutrofili, importanti per le risposte infiammatorie acute. Inoltre l'IL1beta è responsabile indirettamente della **febbre**. Inizialmente fu clonata una proteina chiamata pirogeno endogeno, per la sua capacità di indurre la febbre. Successivamente si è visto che questa proteina non è altro che l'IL1beta, che agisce a livello dell'ipotalamo dove induce la produzione della prostaglandina PGA2.

REGOLAZIONE DELL'IL1BETA

Proprio perché è implicata in diverse funzioni, la IL1beta deve essere finemente regolata. Uno dei meccanismi di regolazione dell'IL1beta avviene proprio a livello della sua produzione e secrezione. Infatti affinchè una cellula secerna IL1beta, occorrono **due segnali**: un segnale (ad esempio l'LPS) che determini la trascrizione del gene e la sintesi della forma inattiva, e un segnale che porti al

clivaggio del precursore attraverso l'attivazione dell'inflammosoma, e quindi della caspasi1. Ad esempio l'attivazione di TRL4 da parte di LPS porta all'attivazione di NFKB, che migra nel nucleo e provoca la trascrizione della pro-IL1beta; un secondo segnale porta all'attivazione dell'inflammosoma, che determina l'attivazione della caspasi1 che cliva la pro-IL1beta e la IL1beta viene rilasciata. Sono tanti i possibili attivatori della trascrizione del gene della IL1beta: non solo i Toll-like-receptors, ma anche gli stessi Nod-like receptors, che possono anche attivare NFKB, quindi attivare l'espressione della pro-IL1beta, la pro-IL18. Anche i RIG-I like receptors possono attivare NFKB. Anche la IL1beta può fungere essa stessa da primo segnale. Il TNF è un altro segnale che può indurre la trascrizione della IL1beta. Ci sono inoltre tanti signals2, che portano all'attivazione dell'inflammosoma: afflusso di k+, virus, proteine che formano canali, PAMP di origine fungina, i "danger signals" come l'ATP. L'ATP infatti normalmente non esiste a livello extra cellulare: quando una cellula va in contro a necrosi, ne rilascia una grande quantità; l'ATP va a legarsi a recettori relativamente specifici che possono mandare il secondo segnale.

Ciò che non è chiaro è come facciano tutti questi secondi segnali ad attivare l'nflammosoma, e che relazione c'è tra il k+, l'ATP, un PAMP che determinano l'assemblamento. Si pensa che tutti questi secondi segnali ad un certo punto vegano integrati in un meccanismo che potrebbe essere la produzione dei radicali liberi dell'ossigeno intracellulari, oppure l'attivazione della proteina ? (sono tutte ipotesi).

I DAMPS

Sono coinvolti quindi anche i DAMPS. I DAMPS sono tutte quelle molecole che possono essere rilasciate da cellule che subiscono un danno grave. Questi DAMPS non solo possono essere riconosciuti dai TLRs, ma possono anche determinare l'attivazione degli inflammosomi, soprattutto DAMP3, che è uno dei sensori capaci di riconoscere DAMPS di varia natura (**ATP, acido urico, afflusso di K+** che deriva dalla apertura dal canale).

I **NLRs** riconoscono PAMP di origine microbica ma anche la famiglia delle allarmine (dei DAMPS) e vanno ad attivare la produzione di mediatori pro-infiammatori attraverso NFkB, così come possono andare ad attivare la caspasi1, responsabile del clivaggio della pro-IL1beta e della pro-IL18. Sono quindi numerosissime le molecole che possono attivare l'inflammosoma: PAMP di origine virale o batterica, tossine batteriche, ATP, radicali dell'ossigeno, microcristalli di acido urico, asbesto, alluminio (*vedi tabella)*

Ci sono dei sistemi di regolazione dell'attivazione dell'inflammosoma che derivano da molecole di origine microbica o endogena. Questa figura (*slide*) elenca una serie di proteine e enzimi, di origine microbica soprattutto, che vanno a interferire con la formazione o l'attivazione dell'inflammosoma, in modo da bloccare la produzione di IL1beta. Si tratta dei meccanismi degli agenti patogeni per evadere questa risposta messa in atto dall'ospite, in modo d difendersi e sfuggirlo.

RECETTORI DELL'INFLAMMOSOMA

Oltre ai membri della famiglia dei NLRs, abbiamo anche altri recettori che possono entrare a far parte dell'inflammosoma: uno di questi è l'inflammosoma AIM2 che riconosce il DNA nel citoplasma, oppure IFI16 che è un sensore per DNA estraneo nel nucleo. Anche queste proteine sono quindi in grado di determinare il rilascio di IL1beta. Anche in questo caso esistono degli inibitori che regolano il processo.

Infine anche RIG-I può far parte dell'inflammosoma. Perciò anche il riconoscimento dell'RNA citoplasmatico a doppia elica può determinare la formazione dell'inflammosma e quindi l'attivazione della caspasi1, con susseguente maturazione e rilascio della IL1beta.

PATOLOGIE ASSOCIATE ALL'IL1beta

L'IL1beta è il mediatore fondamentale di una serie di malattie chiamate **autoinfiammatorie**, una nuova categoria di patologie che si sta inquadrando negli ultimi anni. Rientrano tutta una serie di sindromi che si conoscevano a base eziologica sconosciuta, ritenute incurabili e trattate con sintomatici. Adesso, grazie al fatto che sappiamo a cosa sono dovute, diventa molto più facile la diagnosi e la terapia. Le patologie autoinfiammatorie sono croniche e caratterizzate da febbre ricorrente e intrattabile; sono in pratica inflammosomopatie e derivano da alterazioni, soprattutto genetiche ma non solo, di componenti dell'inflammosoma. L'aspetto clinico è molto simile: sono caratterizzate da attacchi di colite e di febbre molto alta, eritemi cutanei, dolori articolari e a seconda del tipo sierositi, linfoadenopatie, dolori muscolari, orticarie, alterazioni ossee ecc.. Nelle malattie autoinfiammatorie le citochine dominanti sono quelle della famiglia IL1beta e alfa. Invece altre patologie infiammatorie croniche che hanno sintomatologia in parte simile, che sono le patologie autoimmuni, hanno citochine dominanti diverse. Le patologie auoinfiammatorie sono legate a una eccessiva produzione o alterata funzione dell'IL1beta, che non è più controllata. Un tempo queste patologie erano conosciute (la febbre famigliare,diverse sindromi..) ma era difficile fare diagnosi. Si è visto che queste patologie possono coinvolgere mutazioni di NALP3 o di altri componenti della cascata degli inflammosomi che fanno acquisire una gain of function, quindi una funzione incontrollata in cui si ha un inflammosoma iperattivo. La conseguenza è la produzione incontrollata di IL1beta. Oggi queste patologie sono curabili.

Lezione di Patologia generale e fisiopatologia clinica (sem2) del 5/3/2013 (1)

Lezione di patologia generale del 5-03-2013

Cassatella

Sbobinatore: Valeria Bovo

Revisore: Francesca Ligorio

L'inflammasoma è un complesso multiproteico che è in grado di determinare l'elaborazione, la secrezione ed il rilascio di citochine infiammatorie, che sono dei mediatori infiammatori (principalmente IL-1).

L’inflammasoma è costituito da una serie di proteine che si assemblano all’ interno del citoplasma, molte delle quali sono proteine appartenenti alla famiglia dei NLR. Ci sono poi proteine adattatrici che si assemblano al complesso. Il complesso che si viene a formare agisce quindi sulla caspasi 1 (principalmente), oltre che su altre caspasi come ad esempio la caspasi 11. Le caspasi 1 ed 11 sono correlate anche dal punto di vista genomico. Tali evidenze furono ottenute da studi condotti su topi knocked-out. Infatti studiando topi knocked out per la caspasi 1 si scoprì che il gene codificante per essa codificava anche per la caspasi 11: si scoprì casualmente che il mammifero risultava knocked out anche per la caspasi 11. Attualmente sono in corso degli studi su topi knocked out specificamente per la caspasi 11, per vedere cosa regola la caspasi 1 e cosa invece dipende dalla caspasi 11.

Questi inflammosomi si assemblano a livello del citoplasma. Esistono tanti inflammosomi diversi, in grado di riconoscere vari ligandi: PAMP, DAMP, derivati di origine microbica, derivati dalla necrosi delle cellule, frammenti nucleotidici di origine virale etc.

Tali ligandi possono essere riconosciuti mediante vari processi:

-riconosciuti direttamente nel citosol

-con un riconoscimento mediato dal legame con altre proteine

Non è chiaro cosa discrimina il riconoscimento da parte di ciascun inflammosoma, vista la capacità di legare così tanti ligandi, quindi si ritiene che probabilmente ci siano dei segnali di integrazione operati da questi vari ligandi e poi capaci di attivare i vari inflammosomi. Per esempio la produzione di ROS, il rilascio di enzimi lisosomiali, ecc.

Comunque questi inflammosomi si attivano e portano all’attivazione della caspasi 1 e alla degradazione della pro-interleuchina 1 beta e della pro-interleuchina 18 e il rilascio delle loro forme attive.

Esistono poi dei segnali regolatori nei confronti della funzione di tali inflammasomi, alcuni che ne aumenteno e facilitano la funzione (segnali positivi) altri che la inibiscono (=segnali negativi). Fra i segnali che aumentano o inibiscono l’attivazione dell’ inflammasoma abbiamo fattori di virulenza espressi da certi virus e batteri. Ad esempio alcuni virus bloccano assemblaggio dell’ inflammasoma, oppure bloccano l'attivazione della caspasi 1.

In realtà per ogni passaggio della cascata che porta da un lato all’attivazione genica, dall’ altro all’espressione genica o alle fasi di attivazione finale dell’ inflammasoma esistono segnali che vanno ad inibire queste fasi. Questi sono segnali prodotti da proteine o da componenti degli agenti patogeni che cercano appunto di difendersi dalla produzione dell’ IL-1 beta, importante per innescare la risposta infiammatoria; o dall’ IL-18, un’altra citochina importante nel contribuire alla

maturazione dei linfociti TH1 (oltre che per altre funzioni). Come tutti i processi, anche queste funzioni possono essere modulate, potenziate o inibite.

PATOLOGIE AUTOINFIAMMATORIE

Ieri abbiamo concluso la lezione parlando di patologie autoinfiammatorie la cui causa e patogenesi vennero scoperte proprio studiando gli inflammasomi. Si capì infatti che alcune malattie a patogenesi prima sconosciuta sono in realtà legate a mutazioni e modificazioni geniche che vanno a colpire le diverse componenti dell'inflammasoma. Tali malattie rientrano nelle malattie infiammatorie in quanto sono caratterizzate da una varietà si sintomi clinici ma soprattutto da episodi di febbre ricorrenti. Si manifestano soprattutto nei bambini con episodi ricorrenti di infiammazione sistemica. Manifestano correlazioni con l'ereditarietà e **non hanno nulla a che fare con le patologie autoimmuni**, cioè non dipendono dall'attivazione dei linfociti T autoreattivi (che a loro volta innescano la produzione di anticorpi).

I linfociti T autoreattivi sono associati all'immunità specifica mentre nel nostro caso è implicata l'**immunità innata**.

Le sindromi autoimmuni classiche dipendono da alterazioni dell' immunità specifica. L' inflammasoma è invece correlato ad alterazioni che portano a malattie autoimmuni innate.

<u>Esempi di sindromi autoinfiammatorie (vedi slide)</u>

Raggruppano una serie di sindromi molto diverse fra loro dal punto di vista eziologico ma che hanno in comune manifestazioni cliniche.

In particolare una piattaforma molto colpita è quella del NALP3. Queste mutazioni determinano iperattivazione dell' inflammosoma, quindi come risultato l' inflammasoma funziona in maniera incontrollata e produce una quantità maggiore di IL-1. La maggior produzione di IL- 1beta, IL-1 alpha e IL-18 portano poi a tutta una serie di manifestazioni cliniche.

Molecular features delle sindromi autoimmunitarie familiari: non tutte dipendono dall'inflammasoma ma alcune colpiscono la cascata del TNF. Molte sono di recentissima scoperta: man mano che nuovi geni vengono clonati si scoprono anche le rispettive mutazioni: un esempio è IL-36, di cui si è scoperta recentemente una patologia causata da mutazioni del recettore.

(commenta la tabella)

Ad oggi, grazie alla conoscenza di questi processi, è possibile disegnare un algoritmo diagnostico della sintomatologia delle patologie autoimmuni che a partire da informazioni cliniche (sintomi e loro intensità, organo colpito…) favorisce la diagnosi in seguito a combinazione e integrazione dei

dati clinici in nostro possesso. Grazie a queste conoscenze attualmente è possibile caratterizzare queste patologie, fare una diagnosi e intervenire dal punto di vista terapeutico.

Tali patolgie colpiscono prevalentemente l'inflammasoma: o interessano la sua struttura e i componenti, o colpiscono altre componenti di altre proteina che intervengono nella regolazione della struttura macroproteica (a cui quindi sono associate varie patologie). O per alterazioni dell' inflammosoma o per alterazioni del recettore il risultato finale sarà, a seconda dei casi, una maggiore produzione di IL-1 beta, alterazioni della produzione di TNF.

Col tempo si è anche compreso che nella patogenesi di **altre** malattie infiammatorie croniche possono intervenire alterazioni di alcuna componenti dell' inflammosoma. Di seguito sono elencate alcune di esse.

ATEROSCLEROSI: Cristalli ricchi di colesterolo si depositano nella parete vasale ed è possibile che nell'ambito di queste deposizioni ci siano dei cristalli che stimolano direttamente inflammosomi, e quindi la produzione di IL-1 beta. L'aterosclerosi è perciò considerata come una patologia infiammatoria cronica e presenta uno squilibrio patologico che porta alla continua e proungata produzione di mediatori dell' infiammazione.

GOTTA: Malattia infiammatoria acuta caratterizzata da alterato metabolismo dell' acido urico che porta all' accumulo e deposizione a livello articolare di cristalli di urato di sodio, che attivano NLRP3 dell' inflammasoma, con conseguente produzione IL-1beta.

OSTEOARTRITE

DIABETE TIPO II L'iperglicemia può andare a stimolare l'inflammasoma e portare quindi ad aumentati livelli IL-1 beta che a sua volta determina resistenza insulinica.

VITILIGINE Depigmentazione della cute per progressiva assenza di melanociti. È genericamente associata al locus NALP1 (la comparsa dei sintomi è solitamente causata da contatto con la tossina letale di *Bacillus Anthracis).* Si ha maggiore produzione di IL-1 beta che attiva i linfociti T autoreattivi che distruggono i melanociti.

IL quadro che coinvolge l' inflammasoma si sta quindi allargando sempre di più sino a coinvolgere non solo patologie ereditarie ma anche altre malattie infiammatorie croniche delle quali già si conosceva l'implicazione eziopatogenetica dell' IL-1 ma cui oggi si aggiunge una dimostrazione molecolare solida. Le malattie autoinfiammatorie si caratterizzano soprattutto per l' alterata

produzione di IL-1 alpha e beta; certe per alterazioni del TNF. Si discostano quindi da quelle autoimmuni caratterizzate da alterazioni linfociti T e B che possono provocare fenomeni autoimmuni in cui i linfociti reagiscono contro il self causando patologie, talora ad eziologia sconosciuta, e nelle quali le citochine prevalenti sono altre (TNF, IL-6, IL-7).

Attualmente è possibile trattare tali patologie in maniera specifica dato che conosciamo la causa scatanante dal punto di vista molecolare. Quindi possiamo agire bloccando azione di IL-1. Tra le possibilità a nostra disposizione abbiamo inanzitutto la farmacologia:

Farmaci

- ANAKINRA, farmaco attualmente molto in uso (forma ricombinante dell' antagonista di IL-1RA antagonist) IL-1RA è un membro della famiglia delle IL-1 . E una citochina che ha omologia abbastanza marcata con IL-1 alpha e beta che ha la capacità di legare il recettore per queste due citochine (IL- 1 alpha e beta legano lo stesso complesso recettoriale). Anche il ricombinante IL-1R alpha è in grado di legarsi ma funge da antagonista in quanto non induce il segnale di trasduzione intracellulare, però satura i recettori presenti. È quindi un inibitore naturale di IL- 1 alpha e beta: funge da antagonista recettoriale naturale, cioè è una molecola prodotta dalle cellule infiammatorie in seguito a stimolazione che naturalmente inibisce IL-1 alpha e beta. La proteina ricombinante che le case farmaceutiche si sono prodigate a riprodurre è attualmente molto costosa e viene usata in queste patologie in maniera assai efficace.

Quello di IL-1 è un sistema molto sofisticato, controllato da una serie di proteine e fattori che l'industria farmaceutica sta tentando di utilizzare.

Un'altra possibilità è l' utilizzo di anticorpi neutralizzanti contro IL-1 beta o contro le catene recettoriali che sono responsabili per l' induzione del signalling. Gli anticorpi monoclonali, così come ANAKINRA, sono costosi ma efficacissimi: basta una somministrazione ogni 2-3 mesi per ottenere risultati terapeutici fantastici.

RUONACEPT: antagonista recettoriale solubile che lega IL-1beta, 1alpha, IL-1Ralpha. Alcune delle catene di IL-1 receptor possono essere rilasciate e formano composti solubili. La forma solubile può legare il ligando prima ancora che esso leghi il recettore associato alla cellula. L'uso di recettori solubili è quindi un'altra strategia usata. Tutte queste strategie sono poi state usate di recente anche per bloccate TNF.

CANAKINUMAB: anticorpi monoclonali neutralizzanti, molto costosi a straordinariamente efficaci. Invece di inibire IL-1 beta inibiscono il recettore (anti IL-1R 1). Si vanno a legare al recettore bloccandolo: il ligando non lo riconosce e non può attivarlo.

Attualmente sono sotto trials terapeutici guidati.

Tutte queste patologie (*quelle ereditarie*) non solo sono curabili con farmaci specifici, ma vista l' efficacia di questi farmaci e l' assenza di fenomeni collaterali, stanno iniziando a essere adoperati anche in altre patologie infiammatorie croniche (es le artriti dell'adulto, malattie delle ossa e dei muscoli, artrite reumatoide e patologie non necessariamente rare, patologie cardiache, psoriasi, dermatosi).

Sono definiti **farmaci biologici** in quanto vanno a sfruttare le molecole che partecipano alla patogenesi di una data malattia.

-GEVOKINUMAB

-VACCINI TERAPEUTICI CHE LEGANO IL-1 beta

-BLOCCANTI DEL RECETTORE

Possibili applicazioni (slide)

-Malattie ereditarie come FMF, TRAPS (TNF Receptor Associated Periodic Syndrome), Deficienza di IL-1

- Malattie sistemiche infiammatorie

- Malattie infiammatorie relativamente comuni Gotta, diabete tipo II, psoriasi

RIASSUMENDO (vedi slide):

Recettori che riconoscono PAMP di origine microbica, allarmine e DAMP:

1. **TLR 3-7-8-9** riconoscono dsRna

2. **recettori che riconoscono dsRna intracitoplasmatico** Attivano NFkB e MAPK per indurre citochine proinfiammatorie, oppure con un' altra via attivano il sistema TBK1 , IRF3/ 7 che porta all' attivazione di IFN I.

I TLR fanno la stessa cosa: la differenza fra questi 2 sistemi è l' adattatore utilizzato.

3. Ho poi **Recettori citoplasmatici che riconoscono il DNA** e attivano una cascata di trasduzione che attiva da un lato IFN1 e dall' altra citochine proinfiammatorie (NFKB). Questi usano come adattatrice STING

4. **NOD like recepors 1 e 2** riconoscono peptidoglicano (prodotto da micobatteri e G positivi e G-) e attivano citochine proinfiammatorie

5. recettori dell'**inflammasoma** che riconoscono a loro volta PAMP oppure DAMP

Alcuni inflammasomi coinvolgono recettori specifici per il riconoscimento del DNA, tossine "pore forming", tossine letali, meteriale particolato, flagellina. Questi attivano NTRG1b; NLRP3; NLRC4; AIM2 che portano all'attivazione della caspasi 1 che a sua volta è in grado di determinare la degradazione dei precursori di IL-1beta e IL-18 per il loro rilascio.

La cascata attivata da questi recettori comprende sempre citochine proinfiammatorie e quasi sempre IFN 1

EOSINOFILI

Gli eosinofili sono immediatamente riconoscibili nel vetrino colorato. Permettono di ottenere importanti informazioni su molte patologie.

Come distinguerli:

-appartengono alla famiglia dei granulociti

- sono formati da un nucleo bilobato, contengono molti granuli di colorito rosa-rossastro. Si differenziano facilmente dai linfociti sia perché i linfociti sono di dimensioni minori, sia perché i linfociti hanno un nucleo molto grande (rapporto nucleo/ citosol a favore del nucleo)

-possono aumentare durante fenomeni allergici e infestazioni parassitarie

- diametro di 12- 17 micrometri

-il loro citoplasma appare ricco di ribosomi, presenta un grosso apparato di Golgi, microgranuli e mitocondri

DISTRIBUZIONE E CINETICA

-il periodo di maturazione dura circa 17 giorni e avviene nel **midollo osseo**

-emivita nel circolo sanguigno di 6- 12 ore

-una volta **migrati nei tessuti** dove hanno una capacità di sopravvivenza maggiore dei neutrofili. Qui hanno funzione omeostatica, e differenziatesi nei tessuti vi possono permanere molti giorni.

- abbondano nella cute, nel tratto respiratorio, nell'apparato gastrointestinale

- il tasso di eosinofili circolanti varia da poche unità a 350-500 per microlitro

-possono venire rimossi mediante vari metodi: 1. dopo essere stati rilasciati nel lume intestinale o nelle vie aeree, 2. per fagocitosi da parte dei magrofagi 3. per degenerazione cellulare

GRANULI

SI distinguono in **granuli primari** (piccoli) con nucleo ellettrondeso contenente cristalli e matrice extranucleare meno densa e **secondari o grandi** di dimensioni superiori e contenuto omogeneo.

La distinzione in granuli primari e secondari dipende del periodo di maturazione degli stessi: i granuli primari si formano mentre è ancora in atto un processo di differenziazione precoce degli stessi eosinofili, quelli secondari si sviluppano in seguito alla differenziazione dei granuli primari. Al microscopio elettronico posso notare moltissiami granuli diversi fra loro: i granuli primari si riconoscono per la presenza di cristaloide formato da componenti ??.

Nell'uomo i granulociti presentano un nucleo chiaramente affusolato; nel topo il nucleo, pur mantenendosi plurilobato, è per lo più rotondeggiante.

Il contenuto dei granuli eosinofili è relativamente specifico in quanto alcune proteine son contenute esclusivamente nei granuli eosinofilici.

Gli enzimi contenuti nei granuli e fondamentali per la funzione stessa delle cellule sono MBP, ECP,EPO ed EDN.

MBP (major basic protein) è citotossica per i parassiti, organismi batterici e per le stesse cellule che compongono i nostri tessuti;

ECP (eosinophilic cationic protein) possiede azione ribonucleasica ed è responsabile del danno bronchiale.

EPO (eosinophilic perossidase) attiva i leucotrieni C4 e D4

EDN (eosinophilic derived neurotoxin) possiede azione neurotossica, ribonucleasica e debole azione antielmintica.

Sono componenti dei granuli secondari fondamentali per le funzioni che gli eosinofili esercitano contro i parassiti. In generale queste proteine hanno azione citotossica. Tutte hanno azione anti macroparassiti e antielminti ma ognuna può avere altre peculiari proprietà.

Gli eosinofili, nella loro azione biologica, sono regolati da mediatori in parte specifici rispetto agli altri granulociti. Per quanto riguarda la **maturazione**, essa avviane nel midollo ed è facilitata da particolari citochine. Esse sono IL-3, IL-5 e GM- CSF. La più importante in assoluto è IL-5, a essa si aggiungono IL-3 e GM- CSF come coadiuvanti. Tutti questi fattori svolgono un ruolo chiave nella maturazione degli eosinofili da parte del midollo.

IL-3; IL-5 e GM- CSF si avvalgono di complessi recettoriali differenti ma che hanno in comune la catena beta e quindi possono influenzare funzioni comuni, attivate dalla stessa catena. Il fatto che IL-3 , IL-5 e GM-CFS svolgano azione molto simile sugli eosinofili è spiegato dal fatto che abbiano questa catena in comune e la condivisione di catene spiega poi la funzione delle varie famiglie di citochine. Queste citochine sono importanti soprattutto per la maturazione finale delle cellule del midollo, già indirizzate alla linea differenziativa eosinofilica.

Interazioni fra catena beta e porzioni differenti proprie di ogni citochina sono invece responsabili delle differenze nelle vie e/o intermedi di volta in volta utilizzati.

IL-5 media l'adesione cellulare e la maturazione finale delle cellule, una volta che esse sono già indirizzate verso la seria degli eosinofili. Ci sono dei fattori di trascrizione specifici per la maturazione di queste cellule (= master transcription factors) che agiscono concomitantemente. A questo punto le cellule entrano in circolo, migrano e la migrazione tissutale è controllata dal **codice** delle molecole di adesione: **selettine** (PSGL1 e SIallil-Lewis X**) integrine, fattori chemiotattici** (CCR1, CCR2, 3 ,4, 5, 6, 7,8,9; CXCR3, CXCR4, qindi CCL3, CCL4 e CCL5;CCL11 o eotassina, CCL8)**, mediatori di adesione** (ICAM1 , VCAM 1 ; MADCAM!..), **leucotrieni, prostaglandine, PAF. (?)**

CCL11 o eotassina è la più potente e specifica, oltre a essere la più studiata. Svolge un'importantissima azione chemiotattica e filotattica sugli eosinofili. Non solo recluta gli eosinofili ma ne modula le funzione. Infatti ne stimola il rilascio di superossido e la mobilitazione del Ca ++ intracellulare. Regola infine in maniera positiva l'espressione di molecole di adesione, in particolare de parte dell'epitelio bronchiolare.

I fattori chemiotattici non sono costituiti solo dalle chemochine, ma ce e sono molti altri come quelli di origine lipidica (leucotrieni), mediatori lipidici che agiscono sugli eosinofili.

Gli eosinofili migrano omeostaticamente nel trato GI, nella ghiandola mammaria, nel timo e nell' utero e si ritiene abbiano azione di protezione omeostatica dei tessuti nei quali si vanno a localizzare.

Nel **tratto gastrointestinale** esplicano svariate funzioni:

- funzionano come sistema innato di protezione: il cross-linking dei recettori per IgA espressi sulla superficie di queste cellule da parte delle stesse IgA rilasciate nel lume stimola la secrezione dei granuli da parte degli eosinofili; questi hanno poi azione protettiva in quanto tossici nei confronti di parassiti.

- Altra funzione è esprimere, in seguito a danno epiteliale, mediatori che promuovono la riparazione: fra questi FGFs (fibroblast growth factors come FGF2) e TGFbeta., importanti per il rimodellamento delle ferite e il mantenimento dell'integrità della barriera epiteliale .

- Inoltre, come i neutrofili, rilasciano TRAPs, cioè reti di cromatina cui sono collegati proteine nucleari ed il contenuto dei granuli e permettono di intrappolare i batteri. Le reti sono extracellulari e nel caso degli eosinofili vengono prodotte nei mitocondri.

- Infine interagiscono e si associano ai linfociti modulandone la funzione.

Fino a pochi anni fa gli eosinofili erano ritenuti appartenere alle cellule dell'immunità innata e non si comprendevano appieno le loro funzioni: si pensava fossero cellule dalle funzioni generiche deputate alle prime linee di difesa, inviate all' avanguardia a tamponare l'attacco del patogeno in attesa dell' intervento dell' immunità specifica.

In realtà sono in grado di rispondere in maniera molto sofisticata agli stimoli dell'ambiente e possiedono recettori di adesione, recettori per citochine, PRR, recettori per fattori di crescita, FCgamma receptors, recettori per chemiotassine o citochine e recettori per composti lipidici.

I principali mediatori che possono essere rilasciati da queste cellule sono MBP; ECP,EPO;EGP. Tali proteine sono importanti in particolare per la loro azione citotossica ma anche per altre funzioni. I mediatori lipidici prevalentemente controllano il traffico di leucociti o modulano le risposte dell' infiammazione acuta; inoltre la riparazione dei tessuti in caso infiammazioni croniche.

Gli eosinofili maturi possono essere influenzati delle stesse citochine che agiscono nel midollo. Queste, prodotte dai leucociti, ne promuovono sia la **sopravvivenza** che l'attivazione o **priming (potenziamento delle capacità funzionali delle cellule).** In ambiente infiammatorio queste citochine, prodotte in modo particolare dai leucociti, ritardano la morte o attivano il priming.

Il GM-CSF legano sia la catena alfa che una catena beta condivisa con IL-3 e 5 (catena alpha diversa per ogni IL, catena beta comune).

C'è poi IL-33 , di recente scoperta, anch'essa implicata, che si lega a IL-1RL/ ST2 (?), e ad una classe di recettori detti NOTCH, che legano ligandi espressi anche da linfociti. Anche questi segnali quindi (e non solo IL-3 e 5) possono potenziare la **responsività** ai meditori da parte degli eosinofili e quindi potenziarne le attività funzionali, come la capacità di migrazione, il rilascio di granuli, il **respiratory burst** (cioè l'attivazione di NADPH ossidasi che a sua volta è responsabile della produzione di **ROS** come 02-)

IL-5 lega il suo recettore specifico e

- attiva STAT 1,3,5

- attiva le MAPK

- attiva PIP3 e NFKB responsabili dell'adesione e della chemiotassi

Possiamo bloccare in maniera specifica una sola risposta, ad esempio con farmaci che bloccano selettivamente MAP chinasi.

Esistono, anche in questo caso, molecole regolatorie positive e negative.

Gli effetti biologici degli eosinofili sono

- **AMPLIFICAZIONE** E PROLUNGAMENTO DELLA **FLOGOSI**

- **Danno tissutale** concomitante che amplifica, partecipa prolunga un'infiammazione in atto (soprattutto cronica e allergica)

- **KILLING DI MACROPARASSITI** grazie a MBP e le altre proteine contenute nei granuli. La capacità di killing dei parassiti è tipica della polarizzaziazione TH2, e innesca una cascata di mediatori che reclutano ulteriori eosinofili.

Infatti i TH2 attivano i linfociti B i quali a loro volta attivano la produzione di Ig E. Le IgE legano gli eosinofili grazie alla loro porzione FCepsilon (divisa in **FCepsilon type a** e **type b**). Tale legame scatena la liberazione dei granuli e quindi l'uccisione dei macroparassiti. La risposta TH2 innesca la produzione delle citochine IL-4 e 5. IL-4 agisce sulle IgE, mentre la IL-5 sugli eosinofili.

Quindi il riconoscimento dei parassiti da parte degli eosinofili è mediato dalla presenza di antigeni sulla superficie stessa del patogeno: i linfociti producono IgE e le IgE determinano la produzione di mediatori responsabili del reclutamento di eosinofili (e in parte i macrofagi), i veri effettori finali del killing.

Il riconoscimento da parte degli eosinofili è mediato dalla presenza di anticorpi IgE sulla superficie *(del macroparassita).*

Rappresentano quindi un **sistema innato di protezione.**

La citotossicità è legata a meccanismi ossigeno indipendenti (enzimi dei granuli) e ossigeno dipendenti (produzione di ione superossido e acqua ossigenata)

Un'altra caratteristica *(degli eosinofili)* è quella di essere cellule **pleiotropiche**. Sono in grado di rilasciare sia enzimi preformati sia proenzimi (cioè proteasi presenti in forma inattiva nei granuli).

Hanno un ruolo nell'immunità umorale perché **stimolano la sopravvivenza delle plasmacellule** a livello midollare mandando segnali di sopravvivenza. Infatti producono citochine che vanno ad influenzare positivamente l'immunità umorale (infatti sia stimolano le plasmacellule a produrre anticorpi, sia ne favoriscono la sopravvivenza); inoltre influenzano i **linfociti, i mastocti e l'epitelio** mediante il fenomeno noto come cross talk(attraverso cui queste popolazioni cellulari si influenzano a vicenda): interagiscono con linfociti grazie all'intermediazione di mediatori; grazie a citochine controllano pure il metabolismo degli adipociti. Sempre attraverso mediatori e citochine influenzano la risposta immunitaria nel complesso.

Inoltre **possono fungere da APCs** (antigen presenting cells) e **hanno un ruolo nel rimodeling tissutale.**

Gli eosinofili hanno un ruolo nel risolvere la flogosi ("Inflammation resolution"):

Attraverso la produzione di citochine

-inibiscono l'infiltrazione neutrofilica attraverso mediatori lipidici: producono lipossina e resolvina (?): nelle fasi finali dell' infiammazione acuta vengono prodotti questi mediatori che bloccano il richiamo dei neutrofili;

-bloccano l'infiammazione grazie all' interazione con PMNs (polimorfonucleati)

-partecipano a tissue remodeling e repair

-modulano il fenotipo M2 dei macrofagi, ossia quello riparatorio in grado di fagocitare i neutrofili e proteggere i tessuti

-interagiscono con linfociti T e con l'induzione risposte TH2

-priming dei linfociti B e delle plasmacellule attraverso mediatori specifici della famiglia TNF

- interagiscono con cellule dendritiche e macrofagi

Patologie caratterizzate da eosinofilia

Se nelle indagini ematologiche il medico riscontra eosinofilia per prima cosa si devono supporre **allergie** e **parassitosi**. Le patologie caratterizzate da eosinofilia sono infatti innanzitutto:

- allergie, infatti gli eosinofili sono i protagonisti dell' infiammazione allergica cronica

- infestazioni parassitarie (schistosomiasi, filariasi, toxoplasmosi, ascaridasi)

inoltre si può riscontrare eosinofilia in caso di

- alcune malattie infettive (scarlattina, mononucleosi, polmonite da Clamydia…)

- vasculiti e patologie granulomatose

- patologie neoplastiche (ad esempio il linfoma di Hodgkin)

- patologie respiratorie

(sono molte, ve le guardate con calma)

In seguito all'allergia il soggetto sviluppa risposta acuta immediatamente dopo essere venuti in contatto con l'agente patogeno (cioè l'allergene). A questa segue nel tempo un'evoluzione della risposta acuta in una risposta ritardata caratterizzata dalla presenza di eosinofili (late fase reaction caratterizzata da infiltrato formato soprattutto da eosinofili). Vengono prodotte infatti *(nella risposta acuta?)* IL-4 e IL-5 che a loro volta richiamano gli eosinofili. In quest'ottica le reazioni allergiche andrebbero quindi considerate una deviazione patologica dal processo differenziativo TH2, che mira normalmente a distruggere i parassiti ma che nei soggetti allergici innesca queste risposte (pur mancando i parassiti). La domanda è: qual è il ruolo degli eosinofili nelle patologie allergiche? E' una questione molto dibattuta:

- hanno un ruolo altamente proinfiammatorio?

- l'ipotesi prevalente è comunque quella di ritenere la loro funzione prettamente riparatrice, in quanto esprimono fattori in grado di svolgere funzioni che favoriscono la riparazione, come ad esempio TGF beta. Esso favorisce la riparazione endoteliale, la stimolazione delle cellule mesenchimali, la produzione di collagene e altre proteine della matrice e altri fenomeni. Inoltre possono favorire la neoangiogenesi producendo VEGF e IL-8.

Lezione di Patologia generale e fisiopatologia clinica (sem2) del 6/3/2013 (1)

Lezione di Patologia generale e fisiopatologia clinica del 6/03/2013

Sbobinatore: Anna Brunelli

Revisore: Leonardo Lorenzetti

Fisiopatologia, prof. Minuz

MODULAZIONE DEI FLUSSI LOCALI

L'organismo è in grado di direzionare il flusso sanguigno nei diversi distretti a seconda della loro necessità metabolica. Ad esempio durante l'esercizio fisico si ha un aumento dell'afflusso di sangue verso il tessuto muscolare, mentre contemporaneamente altri distretti vengono deprivati di sangue. Ciò è possibile grazie all'attività integrata del centro di controllo vasomotorio (che dà una risposta adrenergica, e che non distingue fra i vari distretti) e dei meccanismi di autoregolazione locale (che hanno nel complesso un peso maggiore).

Esempi di autoregolazione:

- ischemia causa il rilascio di fattori locali che determinano localmente vasodilatazione;

- nella flogosi vi è vasodilatazione e alterazione della permeabilità, mentre nella sepsi l'alterazione del tono vascolare è diffusa (una delle cause dello shock settico).

FUNZIONE EMODINAMICA DELL'ENDOTELIO

Il controllo locale sia in situazioni fisiologiche che patologiche è mediato dalla sintesi di sostanze vasoattive. Ruolo fondamentale hanno le cellule endoteliali che producono 2 principali composti ad attività vasoattiva, l'ossido nitrico e la prostaciclina.

L'NO è il principale regolatore del tono vascolare, allo stato fisiologico i vasi sono leggermente dilatati grazie alla sua continua sintesi e liberazione: si tratta di uno stato tonico di leggera vasodilatazione. Questo tono può essere modificato nel caso subentri uno stimolo vasocostrittore. La disfunzione endoteliale causa una ridotta sintesi basale di ossido nitrico e quindi un aumentato tono vasocostrittore basale dei vasi colpiti, e ad un rimodellamento dei vasi (specialmente nei grossi vasi, con aterosclerosi). Da qui la situazione può poi evolvere verso stati di rimodellamento vascolare e quindi di aterosclerosi.

La prostaciclina è un potentissimo vasodilatatore, su base molare ha la stessa potenza di NO, tuttavia la sua azione è mediata da segnali intracellulari differenti. Le prostacicline hanno più un ruolo compensativo quando vi è assenza di NO oppure di risposta a determinate situazioni. La loro sintesi richiede l'avvio della cascata dell'acido arachidonico e prima di questo l'attivazione della fosfolipasi. Quindi lo stimolo iniziale che ne induce la sintesi deve essere più intenso e consistere di una particolare perturbazione vascolare.

Altre sostanze che agiscono sui vasi:

- le catecolamine, in realtà sono sintetizzate in periferia e rilasciate a livello delle sinapsi, non arrivano dal SNC ai vasi;

- l'endotelina, importante composto peptidico ad alto peso molecolare (82 residui aminoacidici) sintetizzato dalle cellule endoteliali. E' rilasciata in piccole quantità e ha effetti vasocostrittivi, con una durata d'azione piuttosto lunga. La sua sintesi è quantitativamente molto

bassa in condizioni fisiologiche, mentre in situazioni patologiche come l'insufficienza renale o in caso di aumentato rischio cardiovascolare o di danno endoteliale la sua sintesi è più marcata;

- l'angiotensina, che viene prodotta a livello renale e la cui conversione da angiotensina I ad angiotensina II avviene però in molti tessuti, tra cui appunto il tessuto vascolare;

- agenti muscarinici, che hanno un minor peso sul controllo vasomotorio. Ebbero un ruolo importante nella scoperta dell'ossido nitrico (la stimolazione dei recettori muscarinici provoca vasodilatazione per mezzo di NO)

Attività biologiche associate all'endotelio e determinate dalla sua capacità metabolica sono:

- Rimozione di sostanze dal circolo, quali la noradrenalina,

- Modificazione quantitativa di sostanze vasoattive, quali l'ADP,

- Modificazione qualitativa di sostanze, ad es. grazie ad attività enzimatica (come nel caso dell'ACE sull'angiotensina).

Il lume vascolare è quindi costantemente esposto a sostanze vasoattive oppure a stimoli di natura nervosa, quindi sarebbe plausibile pensare che il vaso venga sottoposto continuamente a vasocostrizione e a vasodilatazione in modo alternato, tuttavia ciò non accade. La pressione arteriosa tende infatti ad essere mantenuta costante grazie all'ossido nitrico liberato dalle cellule endoteliali. Essa può comunque variare, ma in modo fine e regolato, ad es. durante l'attività fisica o secondo le risposte adattative (es. spavento) mediate dal sistema nervoso.

L'**ossido nitrico** (NO) deriva dalla cascata metabolica dell'arginina attraverso un enzima costitutivamente espresso nelle cellule endoteliali: l'NO sintasi III. Esso si attiva in risposta alla modificazione del calcio intracellulare e sintetizza ossido nitrico. L'entità degli stimoli varia, così come anche la quantità di NO sintetizzato. Le cellule endoteliali sono però costantemente stimolate e rilasciano quindi in modo continuo NO. L'NO è una molecola altamente apolare, diffonde nelle membrane biologiche. Non è però in grado per questo motivo di viaggiare nel circolo ematico e il suo effetto biologico si esplica in prossimità della cellula che lo ha sintetizzato. Diffonde sia nel lume vascolare dove agisce sulle piastrine, inibendone l'attivazione. A certe concentrazioni ha un effetto antinfiammatorio sui leucociti. Diffonde poi nella parete vascolare dando due effetti: una vasodilatazione immediatamente apprezzabile e conseguente all'aumento di cGMP nella cellula bersaglio, e una modulazione dello stato trofico della parete vascolare. Regola cioè la proliferazione delle cellule muscolari lisce, nonché la funzionalità e la struttura della parete vascolare.

La **prostaciclina** provoca vasodilatazione in modo simile al NO, inducendo un aumento del cAMP a livello delle cellule muscolari lisce del vaso. Causa anch'essa un'inibizione delle piastrine e agisce sulla regolazione trofica del vaso.

E' poi presente un'altra sostanza presente sia in stato fisiologico sia in assenza di NO e che deriva dalla cascata dell'acido arachidonico attraverso la via del citocromo P450: il <u>fattore iperpolarizzante endoteliale</u>, con azione vasodilatante.

Possono agire da modulatori del tono vascolare locale anche il <u>monossido di carbonio</u>, e il <u>potassio</u>. Il tono vascolare tende a rimanere stabile nel tempo, perché la produzione di queste sostanze è mediata spesso da chinasi e la loro sintesi è piuttosto persistente, cioè l'effetto va al di là del legame del mediatore (es adrenalina) ai recettori cellulari.

AUMENTO DELLA SINTESI DI NO

La sintesi di ossido nitrico aumenta in diverse situazioni. L'esempio più tipico è l'ischemia indotta stringendo un bracciale attorno al braccio: il flusso è momentaneamente arrestato per qualche minuto e al rilascio del bracciale esso riprende e si nota vasodilatazione della porzione di vaso posta a monte della zona ischemizzata. Ciò è dovuto appunto al rilascio di ossido nitrico. Se vi sono sostanze in circolo in grado di bloccare la sintesi di NO oppure di degradarlo la vasodilatazione non si verifica. Il fumo di sigaretta contiene alcune di queste sostanze.

Anche nei soggetti con un'elevata colesterolemia la vasodilatazione avviene con difficoltà in quanto nei loro vasi sono presenti sostanze che bloccano la sintesi o degradano NO.

Nel diabete mellito vi è una condizione di disfunzione endoteliale per cui sono presenti composti ad attività pro ossidante che fanno diminuire la quantità di NO rilasciata in risposta agli stimoli.

DISFUNZIONE ENDOTELIALE E RISCHIO CARDIOVASCOLARE

Nei soggetti con aumentato rischio cardiovascolare la disfunzione endoteliale è il primo elemento rilevabile. Essa può essere rilevata precocemente anche tra i bambini in sovrappeso e nei neonati pretermine, situazioni a rischio cardiovascolare. Questa condizione patologica rappresenta una conferma fisica alla correlazione epidemiologica preesistente tra ipercolesterolemia e diabete, e aumento del rischio cardiovascolare. L'integrità dell'endotelio ha un ruolo fondamentale di protezione alla struttura vascolare. Se questa protezione viene persa si innescano delle condizioni di danno vascolare che portano nelle grandi arterie ad aterosclerosi, e nelle piccole arterie a rimodellamento vascolare che accompagna l'ipertensione arteriosa e il diabete. Questo comporta attivazione piastrinica e reclutamento leucocitario tipici dell'aterosclerosi.

L'incapacità del vaso di dilatarsi in questi casi porta anche a problemi a livello del microcircolo a valle del vaso costretto. L'ipoperfusione influisce negativamente sulla capacità di scambio di sostanze a livello capillare. Porta ad esempio a condizioni di anaerobiosi il muscolo in attività del soggetto fumatore. Se io fumo sigarette e poi voglio correre non ottengo una vasodilatazione ottimale. Dopo un pasto ricco di grassi che determina alterazione endoteliale, non ho la risposta vasale che mi aspetto.

La funzionalità del distretto vascolare delle arteriole di resistenza è importante perché oltre a modulare la pressione esse regolano anche i flussi distrettuali e, attraverso gli sfinteri precapillari, anche il flusso al microcircolo. Il flusso nel microcircolo è anch'esso controllato poi da sostanze vasoattive (NO, alcune prostaglandine e in parte la prostaciclina).

REGOLAZIONE FLUSSI DISTRETTUALI

La capacità dell'organismo di regolare il flusso nei diversi circoli distrettuali a seconda dei diversi stati funzionali è assai importante. Un'attività muscolare improvvisa senza questa capacità non sarebbe possibile infatti. È importante che le resistenze vascolari locali diminuiscano, altrimenti si avrebbe una pressione alta con bassi flussi locali.

In altri distretti invece è opportuno che non vi siano variazioni di pressione e di flusso. Ad esempio nel circolo cerebrale:

- Sempre in merito all'attività fisica e all'aumento di pressione che ne consegue, è facilmente intuibile che mentre a livello dei muscoli l'aumento di flusso sanguigno è desiderabile, a livello cerebrale ciò invece non sia affatto auspicabile, data la presenza della scatola cranica ad impedire l'espansione del cervello. Un aumento eccessivo della pressione causerebbe infatti un aumento deleterio della pressione intracranica, con edema e coma.

- In casi di emorragia si ha invece una generale caduta di pressione cui consegue vasocostrizione in più distretti: a livello cerebrale sempre grazie all'autoregolazione si ha una vasodilatazione, in modo tale da preservare l'apporto di ossigeno ai neuroni ed evitare una sofferenza ipossica a quest'organo vitale.

Il circolo in distretti come questo deve essere perciò in grado di autoregolarsi in modo tale da minimizzare le oscillazioni di pressione di flusso.

I distretti circolatori autoregolati sono quelli propri degli **organi vitali**, da preservare: cuore, encefalo, reni.

Vi sono situazioni patologiche in cui questi organi perdono la loro capacità di regolare flusso e pressione:

- Nel feocromocitoma, o nel caso di assunzione di amfetamine che hanno azione adrenomimetica, si possono avere crisi ipertensive gravi con aumento della gittata cardiaca e aumento della pressione intracranica con possibilità di coma e edema cerebrale.

- Nell'enclampsia delle donne gravide si ha una crisi ipertensiva con complicanze spesso a livello neurologico di edemi cerebrali che causano convulsioni e morte.

N.B. I distretti corporei come il muscolo sono definiti come distretti non autoregolati in quanto subiscono passivamente le variazioni di flusso. La vasodilatazione del muscolo in attività è definita sì come risposta locale, ma esso non è in grado di 'isolare' il suo flusso di pressione rispetto agli altri distretti.

Il bilanciamento tra pressione e flusso è attuato grazie a meccanismi locali compensatori:

alta pressione -> diminuzione di flusso

bassa pressione -> aumento di flusso

La regolazione del flusso nei distretti autoregolati può avvenire grazie:

- alla modulazione del **tono miogeno**. Indipendentemente dall'endotelio, c'è una risposta delle cellule muscolari lisce del vaso grazie ad una trasduzione del segnale (sperimentalmente se l'endotelio viene eliminato questo tono miogeno rimane intatto).

- **tono vasodilatante endoteliale**. Più fattori prodotti localmente agiscono come modulatori della risposta.

DISFUNZIONE ENDOTELIALE

La sua prima definizione considerava l'incapacità da parte dell'endotelio di produrre ossido nitrico. In realtà il sistema è più complesso in quanto vi sono anche altre sostanze vasocostrittrici a determinare la risposta vascolare. Una di queste è l'endotelina, la cui sintesi aumenta ad esempio in casi di insufficienza renale. Anche nel diabete mellito la liberazione di NO è diminuita e aumenta l'endotelina.

Oggi quindi la disfunzione endoteliale è considerata più come un'alterazione fenotipica associata al rilascio alterato di mediatori a livello della parete vascolare.

Il termine disfunzione non significa però danno, in quanto essa è una condizione reversibile: dopo due ore dall'aver fumato una sigaretta la risposta vascolare torna normale.

Nel caso dell'ipercolesterolemia si possono infatti introdurre sostanze che allungano l'azione dell'ossido nitrico (es. antiossidanti) ripristinando la vasodilatazione. Ciò significa che la struttura vascolare è intatta, mentre ad essere alterata è la quantità di mediatori che viene rilasciata. E' un'alterazione che può essere ripristinata anche in tempi molto brevi (bambini in sovrappeso).

<u>REGOLAZIONE PRESSORIA</u>

Le arteriole di resistenza possiedono un cospicua tonaca muscolare. Se in questa sede si ha basalmente una ridotta capacità di produrre sostanze vasodilatanti si avrà un tono vasocostrittore basale che tenderà ad essere costante, determinando quindi uno stato di ipertensione cronico dovuto alle elevate resistenze vascolari periferiche (la pressione a monte del circolo arteriolare tende ad essere maggiore).

Questa è la spiegazione per molte forme di ipertensione, ad es. quella secondaria al diabete o ad una dislipidemia. Talvolta sono presenti tutte e tre queste condizioni contemporaneamente.

RIMODELLAMENTO VASCOLARE

Se l'endotelio è mal funzionante vi è un'alterazione del rapporto anche tra endotelio e parete vascolare, per cui lo sviluppo di quest'ultima risulta alterata: si ha una <u>proliferazione delle cellule muscolari lisce e la deposizione di matrice extracellulare</u>. È definito rimodellamento vascolare e <u>avviene anche nel cuore in condizioni di ipertensione cronica</u>. L'ipertensione a sua volta provoca alterazioni nella liberazione di sostanze a livello dell'endotelio in un meccanismo che aggrava ulteriormente l'ipertensione.

Mutazioni geniche che coinvolgono la capacità di sintesi dell'ossido nitrico a livello dei vasi hanno permesso poi di intuire che invece in altri casi la disfunzione endoteliale rappresenta l'innesco iniziale di una vasocostrizione che porta poi alla proliferazione vascolare.

IPERTENSIONE ARTERIOSA

E’ definita come un cronico aumento dei valori della pressione idrostatica sul circolo arterioso, definita anche pressione transmurale. Si tratta di una definizione di tipo operativo, in quanto non vi sono parametri assoluti per classificarla. La pressione dei soggetti varia a seconda dell’età:

Nei soggetti giovani questo grafico avrà una curva piuttosto stretta con delle code laterali ridotte, mentre in soggetti più anziani la campana si distribuisce in modo più ampio, con code laterali più ampie e una deviazione dei valori verso destra. In soggetti molto anziani subentra invece la sindrome disautonomica per cui aumentano i valori verso sx.

L’ipertensione arteriosa è considerata una situazione di aumentato rischio cardiovascolare, cioè un rischio aumentato di avere uno scompenso cardiaco, un’emorragia cerebrale, un infarto cardiaco. La definizione nacque in merito alle statistiche effettuate dalle compagnie di assicurazione statunitensi sui parametri di salute dei loro assicurati. È considerata ipertensione un valore di **pressione massima superiore ai 140 mmHg e una pressione minima maggiore di 90 mmHg**, non è perciò definita da alcun parametro biochimico, biologico o fisiopatologico, se non dal dato epidemiologico.

N.B. Il rischio cardiovascolare è associato ad un incremento stabile del valore pressorio, non a valori momentanei.

La relazione tra aumentato rischio cardiovascolare e ipertensione è rappresentata da una curva molto ripida. Ad esempio un soggetto con un valore di 180/110 mmHg presenta un rischio cardiovascolare circa 10 volte maggiore rispetto ad un soggetto con una pressione di 140/90 mmHg, sebbene entrambi siano soggetti ipertesi.

Il rimodellamento vascolare comporta la cronicizzazione dell’ipertensione: il lume del vaso si fa più ristretto causando un aumento permanente delle resistenza vascolari.

Il **rimodellamento** è dato da due fasi non necessariamente dipendenti l’una dall’altra e correlate ai valori medi di pressione:

- **Rimodellamento eutrofico**: avviene senza ipertrofia. Si tratta di un’iniziale vasocostrizione cui consegue un rimodellamento della matrice extracellulare e una modificazione della collocazione spaziale delle cellule muscolari lisce (esse non presentano un’organizzazione rigida dei filamenti come le cellule muscolari striate, per cui è possibile una ricollocazione spaziale). Il lume del vaso si riduce e data la dipendenza delle resistenze vascolari dalla quarta potenza del raggio, queste aumentano enormemente.

- **Rimodellamento con ipertrofia**: In condizioni di ipertensione più grave o in quelle più persistenti (dove subentra al r. eutrofico). Il lume del vaso è ridotto per l’aumento del numero e delle dimensioni delle cellule muscolari lisce. La parete aumenta di dimensioni facendo restringere il lume vasale.

*Esame del fondo dell’occhio: nel soggetto iperteso la translucenza della parete rispetto al lume è facilmente apprezzabile, per cui le arterie si apprezzano come dei ‘binari’.

Il rimodellamento vascolare da un punto di vista finalistico può tuttavia essere utile: permette infatti di contenere lo stress di parete σ. Questo è definito come la pressione esercitata sulla circonferenza del vaso in funzione della pressione e del diametro del vaso stesso. Maggiore è la pressione e maggiore è il diametro del vaso, maggiore sarà anche lo stress di parete. Aumentando però lo spessore della parete, questo stress diminuisce. L'aumento di spessore di parete e la contemporanea riduzione del raggio (lume) va a cambiare la funzionalità del vaso: fa sì diminuire il flusso e aumentare la pressione a monte, ma rende anche il vaso più solido, meno prono alla rottura (conseguenze tipiche dell'ipertensione sono infatti le emorragie cerebrali in quanto i vasi cerebrali hanno una struttura vascolare meno protetta).

$\sigma = Pr/ 2h$ con σ= stress parietale o forza della sezione; P= pressione; r= raggio; H= spessore di parete

Se riduco del 10% il raggio, la resistenza aumenterà del 50%.

Se riduco del 50% il raggio, la resistenza aumenterà di circa 16 volte, e addirittura di quasi 40 volte se si riduce il raggio di un ulteriore 10%.

La pressione a monte aumenta quindi moltissimo.

Questo è uno dei meccanismi che contribuisce a rendere cronico lo stato ipertensivo: tornare indietro da uno stato di ipertrofia è molto difficile. Ciò presupporrebbe che la pressione si sia normalizzata e che tutti i segnali che hanno contribuito all'ipertrofia siano stati annullati e che sia in atto un processo di rimodellamento negativo. Vi sono evidenze per cui se si riesce a normalizzare la pressione nel tempo poi si può avere una riduzione dello spessore di parete sebbene sia difficile. Ciò è valido anche per l'ipertrofia cardiaca.

L'ipertensione provoca sia l'ipertrofia delle cellule muscolari lisce sia la deposizione tra queste di materiale amorfo extracellulare, inoltre determina a livello delle arterie di conduzione di grosso calibro lo sviluppo delle condizioni predisponenti l'aterosclerosi.

ATEROSCLEROSI

Il fatto che l'ipertensione causi l'aterosclerosi spiega il legame esistente tra ipertensione e morte per eventi cardiocircolatori come l'infarto o le ischemie cerebrali. A livello delle arterie di conduzione se l'endotelio è disfunzionante per elevati livelli di pressione, esso produrrà meno ossido nitrico e in generale minori quantità di composti ad azione inibitoria sull'attivazione piastrinica, sulla migrazione leucocitaria e sull'esposizione di molecole di adesione da parte delle cellule endoteliali verso il lume vasale. In alcune ipertensioni secondarie si rileva anche minor produzione anche di prostacicline.

IPERTENSIONE ARTERIOSA ESSENZIALE

I termini 'essenziale' o 'primario' stanno ad indicare che le cause di questa ipertensione non sono note. Sono definite essenziali la maggior parte delle ipertensioni diagnosticate (circa il 90% delle totali).

Vi sono tuttavia due o tre modelli che spiegano lo sviluppo dell'ipertensione; si tratta di modelli ricavati da studi animali o da studi su base genetica.

- Il primo modello prevede che il disturbo iniziale sia un aumento persistente delle resistenze vascolari periferiche correlato a una disfunzione del tono vasodilatante per cui si ha una cronica vasocostrizione;

- La seconda ipotesi spiega il disturbo come un eccesso di volume in circolo, ossia una cronica ritenzione di sodio e acqua (N.B. è il sodio che determina l'espansione dei volumi circolanti, causando aumento di pressione. La pressione aumenta anche a livello renale dove l'escrezione di sodio aumenta ripristinando l'equilibrio con il sodio introdotto con la dieta).

Probabilmente è il meccanismo che sottosta a gran parte degli stati ipertensivi e che è presente anche nell'iperaldosteronismo.

- La terza ipotesi prevede che la causa iniziale dell'aumento della pressione sia un incremento dell'attività adrenergica. Se si ha un cronico aumento della frequenza cardiaca (su base genica oppure in caso di stress, molto comune nelle ipertensioni tra giovani) si ha un eccesso di portata cardiaca e quindi di pressione. Inoltre l'attività adrenergica agisce direttamente sul tono vascolare. Questo tipo di ipertensione diviene cronica poi per i fenomeni di rimodellamento vascolare.

FATTORI DI SVILUPPO DELL'IPERTENSIONE ARTERIOSA ESSENZIALE

- Ereditarietà. Sono coinvolti diversi cluster genici, vi è anche una componente poligenica.

- Fattori ambientali. Ad esempio il sodio che viene aggiunto al cibo, o condizioni come il diabete o una iperattività adrenergica.

IPERTENSIONI SECONDARIE

Si tratta di condizioni cliniche accompagnate da stati ipertensivi anche molto gravi, nelle quali le cause fisiopatologiche sono ben definite. Pertanto è possibile avere una correzione del danno e una risoluzione dell'ipertensione.

<u>IPERTENSIONE NEFROVASCOLARE</u>

Un modello clinico è stato ricreato sperimentalmente (intorno agli anni '20) con il nome di ipertensione di Goldblatt: nell'animale veniva ristretta una delle due arterie renali in modo tale che uno dei due reni fosse ipoperfuso.

Questa condizione di ipoperfusione è presente in due diverse condizioni patologiche umane:

- Nell’aterosclerosi, come complicanza dell’ipertensione cronica. Una placca aterosclerotica va a restringere il lume di un’arteria renale causando ipoperfusione a quel rene.

- Malformazione congenita, su base genetica o acquisita, in cui per un processo infiammatorio il lume di una delle due arterie renali si riduce.

In caso di stenosi di una delle due arterie renali, a livello dell’apparato iuxtaglomerulare del rene ipoperfuso viene attivato il sistema renina-angiotensina (SRAA).

Viene sintetizzata e rilasciata la renina, che è l’enzima che converte l’angiotensinogeno in angiotensina I.

Su quest’ultima agisce poi un secondo enzima, *l’angiotensin-converting enzyme* (ACE), presente a livello anche delle cellule endoteliali, che la converte in agiotensina II.

L’angiotensina II agisce localmente nel rene promuovendo il riadattamento funzionale del glomerulo all’ipoperfusione.

Essa ha inoltre altri due effetti: aumenta la pressione arteriosa a livello sistemico grazie alla sua forte azione vasocostrittrice (rappresenta uno stimolo quindi poi al rilascio di ossido nitrico localmente).

È in grado poi di agire a livello della zona glomerulare (il prof dice glomerulosa, ndr) del surrene innescando la cascata enzimatica che porta alla sintesi dell’aldosterone. L’aldosterone va ad agire a sua volta sul tubulo distale del nefrone: attiva determinati recettori nucleari che regolano l’espressione del canale apicale del sodio, inducendone la sintesi e causando quindi ritenzione idrosalina.

Inibito dagli alti livelli di pressione, il sistema renina-angiotensina del rene controlaterale iperperfuso non sintetizza né libera la renina che attiverebbe l’angiotensina II.

L’angiotensina II in circolo è elevata e vi è un duplice danno renale:

- Il rene ipoperfuso subisce i danni da ipoperfusione, produce molta angiotensina II che localmente causa un rimodellamento renale che porta alla sclerosi del glomerulo.

- Il rene iperperfuso ha il SRAA inibito, e subisce livelli di pressione così elevati che dopo un po’ danneggiano la struttura vascolare del rene stesso.

Si genera quindi un’ipertensione estremamente grave causata sostanzialmente dall’angiotensina II che è un potente vasocostrittore e dall’espansione dei volumi circolanti. Il rene iperperfuso garantisce la funzionalità renale sino a che anch’esso non subisce un danno troppo elevato a livello glomerulare.

*Se la stenosi fosse bilaterale il danno sarebbe ancora più elevato con entrambi i reni a liberare angiotensina II e molto aldosterone ad innalzare ulteriormente la pressione. N.B. Questa è la situazione propria dell'iperaldosteronismo secondario.

IPERALDOSTERONISMO PRIMARIO

E' una condizione comune, rappresenta circa il 7-8% delle ipertensioni in genere.

In uno o in entrambi i surreni, nella zona glomerulare, la via sintetica che dal colesterolo porta all'aldosterone è accentuata grazie ad un meccanismo non fisiologico.

L'angiotensina II infatti non è elevata nel sangue, in quanto la sua sintesi è inibita dagli alti livelli pressori causati dall'aldosterone in questa condizione.

Spesso questa sintesi eccessiva e continua dell'aldosterone è correlata ad un adenoma, una neoplasia benigna del surrene. Si ha un mancato bilanciamento dei volumi poiché il sistema non viene più controllato dai livelli di angiotensina II circolanti, ne diviene indipendente.

L'aldosterone va ad incidere direttamente sui livelli di pressione, determinando a livello renale una maggior espressione dei canali apicali del sodio. Questo causa inoltre:

- Maggior lavoro per le pompe sodio-potassio per l'aumentata estrusione nell'interstizio del sodio. Ciò causa un'aumentata estrusione nel lume tubulare di potassio e di ioni idrogeno, mentre il cloro viene riassorbito (come cloruro di sodio).

- Maggior dispendio energetico delle cellule tubulari del tratto distale del tubulo collettore.

- Maggior genesi di mitocondri per produrre l'ATP necessaria al sistema di trasporto.

L'aumentato livello di sodio nell'organismo causa anche un aumento del livello di acqua. Si ha quindi un'espansione dei liquidi extracellulari e del volume ematico. La pressione perciò aumenta.

Non si ha edema poiché il rene è normalmente funzionante, è solo 'settato' per riassorbire più sodio di quanto dovrebbe. Il sistema va comunque in pareggio: la quantità maggiore di sodio esce grazie al fatto che il flusso nel tubulo renale è anch'esso maggiore.

La pressione aumenta quindi in modo proporzionale a seconda della quantità in più di sodio che deve essere escreta. Il pareggio di sodio è raggiunto a discapito degli ioni potassio e degli ioni idrogeno che vengono escreti, causando una ipopotassiemia e un'alcalosi metabolica.

Riassumendo in questa condizione si avrà un eccesso di volumi, un aumento molto modesto della concentrazione di sodio nell'organismo, bassi livelli di potassio e un'alcalosi metabolica. Ancora, il sistema renina-angiotensina è totalmente bloccato per l'iperperfusione dei reni.

*Clinicamente l'aldosteronismo primario è facilmente riconoscibile dagli alti livelli di aldosterone nel sangue e dai bassi livelli di renina, elemento per il quale si differenzia da quello secondario in cui anche i livelli di renina sono elevati.

L’iperaldosteronismo secondario causa ipertensione per un eccesso di angiotensina II. Utilizzando un diuretico che aumenta, a parità di condizioni, l’escrezione del sodio l’unico effetto che si avrà sarà una diminuzione della pressione.

FEOCROMOCITOMA

È causato da un’alterata regolazione della generazione di catecolamine. All’interno della midollare del surrene si sviluppa un’iperplasia, un adenoma che tende a crescere spropositatamente e che sintetizza catecolamine in modo non regolato. Normalmente la midollare del surrene libera le catecolamine durante le risposte adattative quali lo spavento, o situazioni stressanti. Le catecolamine agiscono poi sul sistema cardiocircolatorio inducendo vasocostrizione e quindi un aumento di pressione, fanno aumentare la frequenza cardiaca e quindi anche il lavoro cardiaco. Agiscono poi sul sistema nervoso e sul sistema respiratorio.

Nel feocromocitoma i meccanismi con i quali le catecolamine vengono rilasciate in circolo sono molto variabili, per cui accade spesso che si abbiano brusche e gravi variazioni di pressione, specialmente nelle prime fasi della malattia. Questo andamento oscillante dei valori delle catecolamine comporta il fatto che a gravi crisi ipertensive spesso seguano delle crisi ipotensive: quando i livelli di catecolamine sono alti nel sangue si ha un aumento di pressione che fa aumentare anche l’escrezione renale, quando esse poi diminuiscono bruscamente questo deficit di volume causerà appunto brusche cadute di pressione.

Col progredire della malattia i livelli di ipertensione raggiunti sono così alti da dare sofferenze cerebrali o cardiache, edemi e emorragie cerebrali, ischemie cardiache.

Cocaina e amfetamine sono sostanze mimetiche delle catecolamine, per cui danno i medesimi effetti, bruschi innalzamenti pressori incontrollati.

Lezione di Patologia generale e fisiopatologia clinica (sem2) del 11/3/2013 (1)

Prof. Marco Antonio Cassatella Data 11/03/2013

Sbobinatore: Caridha Denis

Revisore: Mazzo Umberto

(*manca riferimento alle slide non essendo ancora state caricate, Ndr*)

EOSINOFILI

Gli eosinofili sono importanti nel rimodellamento grazie alla secrezione di fattori di crescita. Poi possono rilasciare mediatori di origine lipidica, proteine, prostaglandine, BAF,neuromediatori e tutta una serie di chemochine che sono quelle che appartengono del mondo del Th2, eosinofili e basofili. Questi producono citochine e chemochine che servono a reclutarsi e amplificare il reclutamento di altri componenti del Th2, e tutta una serie di prodotti citotossici come la **perossidasi eosinofilica, MBP(major basic protein), EFP(eosinophily factor protein), EDE (endotoxide derivated protein) e LDL minore** che è una metallo proteasi che è importante per l'angiogenesi.

Non solo le cellule dell'immunità innata interagiscono tra di loro ma anche con quelle dell'immunità specifica aiutandosi tra di loro (crosstalk). Così come abbiamo visto i neutrofili, anche i eosinofili possono interagire con altri leucociti. Quindi:

- **possono favorire il reclutamento del Th2 -->** attraverso la produzione di chemochine
- **possono fare il priming a livello dei linfociti B -->** quindi possono potenziare la capacità di questi linfociti di produrre IgM
- **possono anche regolare la sopravvivanza dei plasmablasti nel midollo -->** questo avviene grazie al fatto che queste cellule producono la citochina **APRIL** che è coadiuvata da **IL-6.** Queste citochine sono state scoperte gli ultimi anni e sono molto importanti per i linfociti B.

Sono importanti:

- per la maturazione

- per la sopravvivenza

- per indurre la produzione di anticorpi

Queste citochine appartengono alla **famiglia dei TNF.** Nel giro di pochi anni si sono prima clonate, poi scoperto l'attività biologica, poi scoperto l'importanza nelle malattie ed oggi ci cono dei farmaci che bloccano in maniera specifica questo APRIL. Gli eosinofil fanno APRIL, mentre i neutrofili fanno BAF. Possono collaborare e favorire la maturazione delle cellule dendritiche, mastociti, macrofagi, neutrofili,linfociti,attivando la funzione di queste cellule.

Una delle peculiarità riguardanti gli eosinofili è che essi fanno parte di quella che viene definita la **Reazione infiammatoria allergica ritardata.** Cioè quella che si osserva dopo una risposta acuta in seguito a esposizione ad allergeni che determina una flogosi che si caratterizza per accumulo di eosinofili. Anche se oggi questa infiammazione allergica si sta capendo che in realtà è molto variabile, comunque nella maggior parte dei casi gli eosinofili sono reclutati e rappresentano uno dei componenti fondamentali di questa risposta.

A che cosa servono gli eosinofili?

Ancora oggi non è chiaro qual è il ruolo degli eosinofili in questa situazione allergica. Non si capisce se sono cellule che provocano danno, cioè vengono richiamate, attivate e provocano la risposta infiammatoria, oppure avvengono in un altro modo. Tutto non è chiaro perchè dipende dai topi knockout, dal uso di farmaci che servono a inibire gli eosinofili. Quest' ultimi si è visto che hanno vari ruoli in determinati momenti.

Questa infiammazione allergica dipende dal fatto che si attivano risposte Th2 in seguito all'esposizione ad allergeni. Quindi viene indotta la maturazione, la polarizzazione dei linfociti Th2 che sono fondamentali in questa risposta perchè producono citochine che rappresentano i marcatori di queste cellule. Queste sono **IL-4** e **IL-5**(anche **IL-13**). Nelle infiammazioni allergiche sono state scoperte vari sottotipi di citochine, di linfociti T helper etc. Queste due tipi di citochine sono fondamentali perchè:

- **IL-4**

1. attiva la produzione di IgE da parte dei linfociti B
2. induce l'espressione di ICAM1 a livello dell'endotelio

Tutto questo favorisce la l'azione e il reclutamento delle cellule della risposta Th2, compresi gli eosinofili. Poi i Th2 producono IL-5.

- **IL-5**

1. agisce sugli eosinofili
2. favorisce la maturazione di eosinofili da parte del midollo
3. favorisce la loro sopravvivenza
4. mantiene la funzionalità
5. agisce sui mastociti che sono un altra cellula dell'immunità alle risposte allergiche acute.

Quando gli eosinofili si attivano producono mediatori da una parte responsabili dei fenomeni acuti e dall'altra parte che innescano un infiammazione allergica tra cui per esempio formano la produzione di IL-5, la produzione di chemochine che reclutano gli eosinofili e altre cellule.

(Parla della successiva diapositiva)....É il caso dell'esposizione ad allergeni e tutti i potenziali meccanismi che portano al reclutamento di eosinofili, compresa la maturazione nel midollo, le citochine, le chemochine, le molecole di adesione che vengono attivate per favorire il richiamo dei leucociti eosinofili. Importante è il **CCL 11**, cioè un eotassina. Altre molecole prodotte dai Th2, dagli eosinofili, dalle cellule dell'ambiente possono essere implicati nel rimodellamento, o nell'aumentata responsività delle vie aeree (nel caso della risposta asmatica), che è uno dei fenomeni per cui sono responsabili gli eosinofili. Anche altre chemochine come **CCL 3, Myc 1α, CLC2, CCL7** sono coinvolte in questa risposta. Poi c'è anche un altra molecola fondamentale che è la **STAT6**, che è un fattore di trascrizione attivato da IL-4, IL-13, che sono citochine Th2. Topi knockout per STAT6 non rispondono a queste due citochine, quindi in questi animali questi fenomeni non si osservano a dimostrazione dell' importanza di questo circuito.

Le funzioni potenziali degli eosinofili nell'ambito della risposta infiammatoria allergica sono:

- Da una parte queste cellule, sempre attraverso la produzione dei loro mediatori, aggravano l'infiammazione. Si parla di iper-responsività delle risposte a livello delle vie aeree, perche questi mediatori prodotti dagli eosinofili vanno:

- a provocare danno

- a stimolare i mastociti a produrre ulteriormente mediatori che perpetuano i fenomeni infiammatori

- inducono la contrazione delle cellule muscolari lisce

-danneggiano l'epitelio e così amplificano la risposta infiammatoria e la cronicizzano.

- Dall'altra parte c'è un azione mediata dagli eosinofili, che è quella che si considera più importante, è il cosi detto rimodellamento. Gli eosinofili sono in grado di produrre dei mediatori pro-angiogenetici, pro-fibrotici ma in questo caso invece verrebbero reclutati per avere una funzione riparativa. Questo avviene grazie alla produzione di varie citochine, come per esempio il **TGF-B**, che vanno ad agire sui fibroblasti inducendo la proliferazione, la differenzazione.

In topi nei quali vengono indotti questi fenomeni se vengono somministrati anticorpi contro IL-5 non si osserva nessun effetto, escludendo il ruolo importante degli eosinofili nelle infiammazioni allergiche. C'è chi dice che questi anticorpi vadano a bloccare la traduzione ma non agiscano a livello locale. Quindi magari gli eosinofili sono già presenti, per questo non si riesce a vedere differenze a livello del fenotipo.

Una delle citochine che gli eosinofili sono in grado di produrre in grande quantità è il **TGF-B.** Esso è in grado di indurre una seria di risposte in diversi ambiti, ma una delle sue funzioni più importanti è quella di indurre la formazione di tessuto connettivo, cioè funzione riparatrice. TGF-B ha anche altre funzioni biologiche che dipendono dal tipo,dalla concentrazione, dalla cellula che risponde, dai recettori che esprime. Di questa citochina ne esistono vari tipi: TGF-B1, TGF-B2, TGF-B3. La sua caratteristica peculiare è quella di essere sintetizzata e rilasciata in forma inattiva a livello extracellulare, complessato con una proteina inibitrice. Nell'ambiente può essere attivato da proteasi che lo attivano.

Il TGF-B ha alcune azioni "veloci" quando viene rilasciato dagli eosinofili:

- favorisce la produzione di nuove cellule epiteliali
- agisce sulle cellule mesenchimali attivando la proliferazione, la produzione di collagene e di altre sostanze della matrice, favorendo il rimodellamento tissutale.
- induce la neo-angiogenesi (formazione di nuovi vasi da quelli pre-esistenti).

È un processo fisiopatologico che avviene durante le risposte infiammatorie e in altre situazioni,ad esempio per favorire la crescita tumorale.

Gli eosinofili rilasciano una serie di molecole in grado favorire l'angiogenesi. Per esempio **VEGF** (vascular andotelial growth factor), che è considerata come un prototipo di questa azione. Inizialmente essa era considerata di favorire la permeabilità dei vasi ed era conosciuta come **VPF** (vascular permeabilitty factor), molecola prodotta in fase acuta dell'infiammazione. VEGF è contenuto in grande quantità nei granuli dei **neutrofili** favorendo la vaso permeabilità, importante nella formazione dell'essudato. Attività simile hanno **VFGF 1-2**, **IL-8**. Inoltre alcune chemochine hanno capacità pro-angiogenetica, mentre altre hanno funzione angiostatica, cioè inibiscono l'angiogenesi. **LRT9** è una metalloproteasi che ha la capacità di degradare la membrana basale e favorire il movimento delle cellule endoteliali che sono state stimolate tramite **EGF** a proliferare e dare origine a nuovi vasi da quelli pre-esistenti.

Anche i mastociti e i basofili sono in grado di produrre e rilasciare fattori che sono importanti per l'angiogenesi. Le cellule della flogosi allergica, compresi gli eosinofili, mastociti e basofili, partecipano a questo fenomeno.

(slide successiva,Ndr) Mostra delle **strategie terapeutiche** per intervenire nei casi di eosinofilia,dove il numero degli eosinofili è molto alto. È possibile intervenire:

a) andando ad inibire le chemochine che favoriscono gli eosinofili

b) sulle molecole di adesione che sono responsabili del richiamo di queste cellule.

c) con anticorpi che bloccano IL-13 e IL-4, citochine prodotte dai Th2, che innescano le risposte mediate dagli eosinofili.

d) bloccando la sopravvivenza degli eosinofili. Questo avviene tramite anticorpi che agiscono sul recettore di questa citochina, precisamente sulla catena α che è responsabile del legame della citochina IL-5.

IL-5, IL-17, IL-3 legano recettori specifici che hanno in comune la catena β, imentre la catena α è specifica per ogni citochina. IL-33 nuova citochina clonata qualche anno fa e che fa parte del gruppo Th2.

Un altra famiglia di farmaci che agisce sugli eosinofili è la famiglia dei **corticosteroidi.** Questi sono farmaci antinfiammatori che hanno degli ottimi effetti nella maggior parte dei casi. Però il loro uso può provocare degli effetti collaterali gravissimi. Noi non conosciamo bene il meccanismo molecolare con cui loro funzionano, perchè hanno effetti molto variabili a secondo del tipo della cellula, della dose e di altri fattori.

I corticosteroidi sono in grado di funzionare a livello degli **eosinofili** perchè:

- riducono il numero degli eosinofili, cioè diminuiscono l'eosinofilia nel sangue e nei tessuti attraverso una serie di meccanismi che favoriscono la morte e l'eliminazione di queste cellule

Nei **neutrofili** i corticosteroidi hanno un effetto opposto:

- promuovono la sopravvivenza

- aumentano il numero dei neutrofili nel sangue

- favoriscono le funzioni

- attivano anche un programma genetico che stabilisce l'azione antinfiammatoria dei neutrofili

I corticosteroidi aumentano il numero dei neutrofili nel sangue agendo su un pool di neutrofili marginati. Questo pool si localizza nei polmoni, nel fegato, nella milza adeso alle cellule endoteliali. Se si somministrano dei glucocorticoidi si ha una demarginazione, un distacco del pool di neutrofili dalle cellule endoteliali e c'è un aumento rapido del numero dei neutrofili nel sangue. (Per ottenere da un individuo dei neutrofili per isolarli e studiarli si da una una grande quantità di

steroidi. Questo provoca un aumento transiente dei neutrofili. Gli steroidi come anche i neutrofili si trovano con l'esame emocromocitometrico)

I corticosteroidi :

1. favoriscono l'apoptosi degli eosinofili con aumento di produzione di radicali liberi di ossigeno
2. inibiscono la produzione di fattori di sopravvivenza di queste cellule, come IL-5, IL-3, IL-17
3. favoriscono la fagocitosi attraverso i macrofagi delle cellule apoptotiche

GRANULOCITI BASOFILI e MASTOCITI

-I basofili sono presenti nel sangue in una quantità molto bassa (max 1%). Presentano al loro interno dei granuli che si colorano in blu scuro con ematosilina-eosina, che li rendono facilmente identificabili in un vetrino. Sono cellule del sangue che poi vengono reclutati nei tessuti.

-I mastociti sono cellule tessutali. Hanno funzioni simili a quelle dei basofili, ma derivano da precursori diversi. Fattori di crescita nel midollo osseo favoriscono la maturazione verso un tipo o l'altro.

Nel caso dei basofili è la citochina **IL-3** che induce la maturazione di queste cellule, mentre nel caso dei mastociti è lo **SCF** (stem cell factor) che è collegato al recetore che si chiama **c-Kit**.

Questi termini verranno fuori **nei tumori** in quanto esistono forme mutate di queste molecole, come il c-Kit, che fuzionano come oncogeni. Cioè geni responsabili della patogenesi dei tumori maligni.

Differenze mastociti/granulociti basofili:

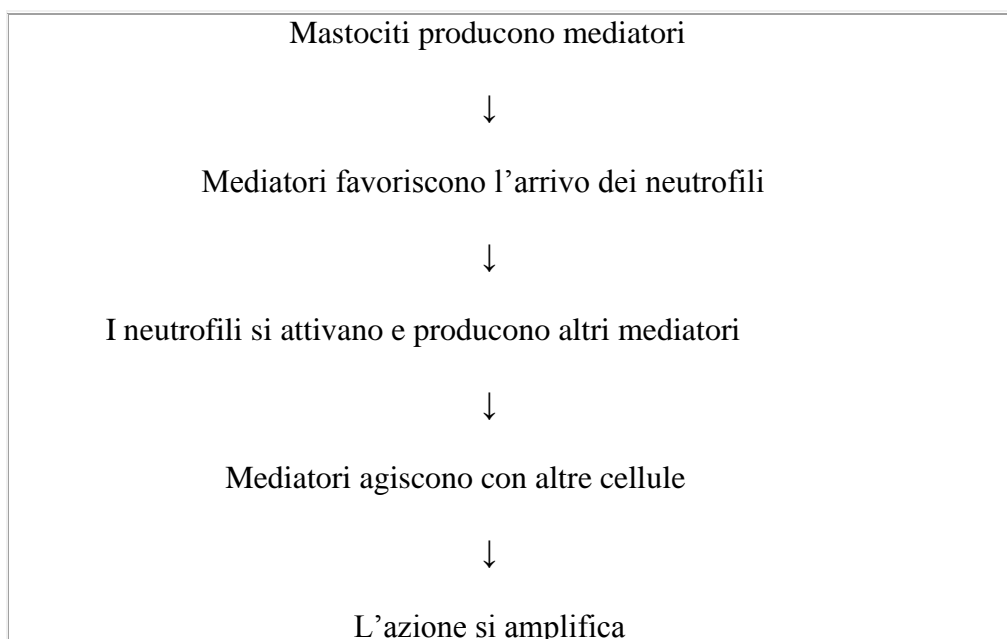
- Ø nel connettivo i mastociti sopravvivono per vari mesi, i basofili per giorni
- Ø presentano delle differenze nella dimensione, nel nucleo, nel contenuto di istamina. I mastociti contengono spesso quantità elevate di istamina (ma anche i basofili contengono istamina)
- Ø i granuli nel caso dei mastociti sono più piccoli e più numerosi, invece nei basofili più grandi e meno numerosi

Il contenuto all'interno dei granuli di queste cellule è molto simile ma ci sono anche delle differenze:

- Per esempio gli enzimi **chinasi** e **triptasi**, sono presenti in quantità molto superiore nei mastociti. Esistono degli anticorpi che riconoscono questi enzimi e permettono cosi di identificare i mastociti nei tessuti.
- I mediatori lipidici sono in parte simili e in parte diversi. I mastociti producono alcuni mediatori di origine lipidica che non sono prodotti dai basofili in quanto esprimono gli enzimi che metabolizzano questi composti (*non dice quali, Ndr*).

Oggi su base di marcatori e altri parametri si stanno considerando dei mastociti che si localizzano in vari tessuti, come i mastociti connettivali e mastociti delle mucose.

I mastociti sono fondamentali per innescare la **flogosi acuta.** Essi si vanno a localizzare nei tessuti, molto spesso vicino alle giunzioni capillari. Sono delle cellule che percepiscono cambiamenti nell'ambiente. In risposta:

1. producono mediatori per favorire l'apertura dei capillari consentendo maggiori scambi nutritizi.
2. rilasciano il contenuto dei granuli, cioè mediatori che innescano la risposta infiammatoria acuta. L'istamina prodotta dai mastociti determina l'aumento della permeabilità e l'attivazione di una serie di altri enzimi che portano alla risposta infiammatoria acuta.

Un altra caratteristica dei mastociti è che contengono **TNF** già preformato. Il TNF insieme all' **IL-1** è la citochina pro-infiammatorie primarie per antonomasia. Di norma il TNF non è tenuto immagazzinato dalle cellule ma deve essere sintetizzato exnovo in seguito a stimoli in grado di attivarne la trascrizione. Questo non avviene nei **mastociti i qualli hanno del TNF già immagazzinato**. Per cui quando questi sono stimolati possono rilasciare il TNF in giro di pochi minuti il quale scatena l'effetto infiammatorio. Possono anche sintetizzarlo exnovo una volta che i granuli sono stati rilasciati.

I mastociti vengono attivati dalle:

- **IgE** che si legano ai recettori *presenti nella loro membrana.* Le IgE sono importanti nelle risposte Th2 ma non sono gli unici stimoli.
- Componenti del sistema del complemento: C3a C5a
- Neuropeptidi
- L'anione superossido
- Lipidi

- PAF
- Leucotrieni
- Prostaglandine
- Citochine
- PAMP
- stimolo di origine microbica
- sostanze che si usano in laboratorio, sostanze secretagoghe, cioè stimolano la degranulazione facendo entrare Ca^{2+} nelle cellule. Questo può portare anche altri effetti. Ad esempio stimola l'apparato filamentoso della contrazione agendo sulla bradichinina.

Quando queste cellule sono attivate rilasciano vari mediatori comprese:

- le amine vasoattive, come l'istamina, responsabile della vasodilatazione e dell'aumento della permeabilità

- mediatori di origine lipidica

- PAF, Il-4 responsabili della broncocostrizione e della ipermotilità intestinale

- Citochine, TNF

- Enzimi, triptasi, che se presenti in grandi quantità possono degradare proteine che danno origine al danno tessutale

Per quanto riguarda i granulociti gli stimoli di attivazione sono simili a quelli dei mastociti, in più agiscono PAF, IL-3, IL-18, papaina, IL-33. Queste cellule:

- rilasciano IL-6, IL-4, IL-13, TNF, tutte citochine importanti del Th2,
- aumentano dell'espressione di molecole costimolatorie,
- Aumentano l'espressione di antigeni di classe 2 o di classe 1

E' importante capire quali sono i segnali intracellulari che ciascuna di queste citochine induce per attivare la risposta, ma anche soprattutto capire quale via di trasduzione è responsabile di una determinata risposta rispetto all'altra.

IL-3 e **CSF** *(poco chiaro il nome della seconda molecola riportata, Ndr)* sono specifiche per gli eosinofili e possono favorire la loro sopravvivenza. In particolare IL-3 promuove la loro maturazione nel midollo osseo attivando la **chinasi Jack 2** che fosforila **STAT 5**, il fattore di trascrizione chiave per promuovere queste funzioni. (se vogliamo bloccare la produzione di precursori di basofili possiamo bloccare la STAT 5).

Basofili, eosinofili e mastociti rilasciano istamina, 5-idrossitriptamina, serotonina, chinasi, triptasi, citochine, chemochine ed altre molecole. Queste cellule hanno la capacità di interagire con altri leucociti. I mastociti possono interagire con i linfociti T e attivarli, e possono favorire l'attivazione e la proliferazione dei linfociti B con la produzione di determinati tipi di Ig.

Malattie in cui i mastociti giocano un ruolo sono: **l'asma**, **dermatite atopica** e altre malattie infiammatorie.

I **mastociti** possono avere un azione fisiologica, in generale protettiva. Le azioni di queste molecole sono in relazione ai tipi di mediatori prodotti. Queste azioni comprendono:

- Ø Riparazione delle ferite
- Ø Motilità intestinale
- Ø Rimodellamento delle ossa
- Ø Angiogenesi
- Ø Difese contro agenti patogeni

Ci sono però anche effetti patologici come:

- Ø Malattie allergiche
- Ø Malattie autoimmunitarie
- Ø Tumori, quando favoriscono la crescita cellulare

Basofili ed **eosinofili** invece si attivano durante le infezioni primarie da elminti e da macroparassiti. Possono attivare dei recettori e produrre certi mediatori che direttamente o indirettamente possono favorire l'eliminazione di questi agenti patogeni. Per esempio nel caso di infezioni da zecca i basofili sono importanti nei meccanismi di difesa.

I basofili possono promuovere la differenzazione dei linfociti Th2. Non è chiaro quale sia la sorgente di **IL-4** nel momento in cui avviene la presentazione dell'antigene da parte dell'APC al linfocita T vergine sapendo che **IL-4 è la citochina che promuove la maturazione verso il sottotipo Th2**. È probabile che questa sorgente siano i basofili. Inizialmente si pensava che la maturazione verso Th2 fosse una maturazione di default, cioè quando avviene una presentazione dell'antigene i linfociti maturano verso il Th2, a meno che nell'ambiente non ci sia **IL-12**. Questa è prodotta dalle cellule dendritiche o da altre le APC stimolate dai TRL attivati dai patogeni, o prodotta da qualche cellula dell'ambiente. Per default i Th0 (T helper) vanno verso i Th2. I **T helper** si pensa che possano produrre bassi livelli di IL-4.

Nel topo è stato dimostrato che le cellule che **forniscono IL-4** sono **i basofili** e in questo modo aiutano l'inizio della risposta Th2 nei linfonodi.

I basofili sono reclutati attraverso i vasi nei linfonodi

↓

incontrano le cellule dendritiche e i linfociti T naive

↓

producono IL-4

↓

favorisce la maturazione verso il Th2

Questa comunque è un'ipotesi.

I basofili potrebbero funzionare anche come APC e durante l'interazione con i linfociti T vergini produrrebbero IL-4.

Il **mondo Th2** è fatto da linfociti T helper 2, linfociti B che producono IgE, eosinofili e basofili.

I basofili che vanno ai linfonodi in maniera transiente e direttamente o indirettamente favoriscono l'attivazione.

I neutrofili vanno pure essi ai linfonodi, prima delle cellule dendritiche. Essi presentano antigene, favoriscono le cellule dendritiche, modulano etc.

(Il prof sottolinea di ricordare i meccanismi dell'ipersensibilità immediata!, Ndr)

Questi meccanismi allergici di primo tipo rappresentano una risposta deviata dei linfociti Th2 contro allergeni e che si avvalgono degli stessi meccanismi di cui si è parlato sopra.

Citochine Th2

Sono glicoproteine di baso peso molecolare (circa 10-30 KDa) che vanno a collegare le cellule tra di loro, cioè le fanno comunicare. Sono coinvolte quindi anche nella regolazione della funzione delle cellule immunitarie. La citochina non è prodotta e rilasciata in maniera costitutiva dalla cellula, con determinate eccezioni. Essa richiede uno stimolo che agisce su una cellula, che risponde sintetizzando e rilasciando la citochina. Non sempre è sufficiente ma a volte ne servono 2. La citochina rilasciata funziona su cellule bersaglio legandosi al recettore e induce una serie di segnali che producono una risposta biologica.

I meccanismi di risposta da parte delle citochine sono divise in:

- **Azione autocrina** à si intende l'azione della citochina sulla cellula che l'ha prodotta. Un esempio di quest'azione è rappresentato dall'**IL-2.** Quest'ultima comincia a stimolare il linfocita T che sta riconoscendo l'antigene. A questo punto il linfocita T comincia a proliferare e ad attivarsi. Poi a seconda dell'ambiente il linfocita diventa Th2 o Th1.
- **Azione paracrina** à la cellula stimolata produce citochine che vengono rilasciate e che agiscono a livello locale, cioè sulle cellule vicine. Con questo meccanismo agiscono le **chemochine,** ma una tipica azione paracrina è rappresentata dall'**IFN 1**. Cellula infettata da virus risponde con la produzione di IFN e muore per proteggere la cellula vicina, impedendo cosi la proliferazione del virus.
- **Azione endocrina** à avviene quando nell'ambiente avviene una produzione di una grandissima quantità di citochine che riescono ad entrare in circolo e si diffondono. Vanno a produrre delle risposte a livello sistemico a seconda dell'organo o tessuto che risponde. Un esempio classico è rappresentata dalla **risposta della fase acuta a livelli sistemici dell'infiammazione**. TNF e IL-1 (e anche IL-6) quando sono prodotte in grandi quantità entrano in circolo e inducono con altre citochine e poi si ha la risposta.

Un’modalità interessante si osserva quando le citochine non vengono rilasciate in forma solubile ma rimangono attaccate alla membrana. Quindi la molecola attaccata alla membrana può attivare una cellula vicina direttamente. Questa modalità è osservata in modo particolare nel caso dei **membri della superfamiglia dei TNF** che sono delle citochine che quando vengono sintetizzate vanno prima a localizzarsi sulla membrana. Lì possono intervenire e possono esercitare la loro attività biologica. Poi sulla membrana possono essere degradati da enzimi che sono molto specifici e che sono localizzati a questo livello. In questo modo favoriscono il rilascio della molecola TNF in forma solubile che poi può agire.

Ci sono addirittura delle citochine che agiscono a livello intracellulare. Esse vengono sintetizzate dentro la cellula e funzionano al suo interno.

Ci sono una serie di differenza tra citochine e ormoni:

- Le citochine sono proteine o glicoproteine. Gli ormoni possono essere rappresentati sia da proteine, ma anche da altri composti come per esempio dagli derivati degli acidi aromatici

- Tutte le cellule possono potenzialmente produrre citochine. Gli ormoni invece sono prodotti da cellule deputate in maniera specifica alla loro produzione, le ghiandole endocrine.
- Le citochine hanno azione autocrina, paracrina ed endocrina. Gli ormoni, con qualche eccezione, in genere hanno un azione endocrina.
- Le citochine possono funzionare da ligando per recettori che sono distribuiti su cellule molto diverse tra di loro. Gli ormoni hanno una distribuzione molto più ristretta e specifica dei recettori che li legano
- Le citochine possono avere azione proliferativa, mitogenetica. Gli ormoni sono raramente mitogenici, cioè raramente causano proliferazione
- Citochine diverse possono indurre la stessa risposta. Ormoni diversi non possono indurre la stessa azione biologica.

- La produzione delle citochine è un evento che deve essere limitato, controllato. I meccanismi del suo controllo sono super sofisticati. Ci sono controlli a livello trascrizionale, del processamento all’interno del nucleo, del trasporto dal nucleo all’interno del citoplasma, della stabilità e traducibilità dell’mRNA.

Quindi è importante capire quali sono i stimoli che modulano, cioè inibiscono o potenziano, la produzione di una determinata citochina in una determinata situazione. La fonte cellulare non è una caratteristica che contraddistingue queste molecole. Quindi la stessa citochina può essere prodotta da cellule diverse, magari sottoposte allo stesso stimolo.

- Per le citochine si dice che hanno **azione pleiotropica,** cioè possano agire su tipi cellulari diversi, con effetti però che possono essere differenti. Per esempio IL-4 può agire sui linfociti B, sui timociti, sui mastociti con risposte simili o diverse.

- Le citochine sono spesso **ridondanti**. Quindi citochine diverse possono indurre più o meno la stessa risposta. Per esempio IL-2, IL-4, IL-5 possono favorire la proliferazione dei linfociti B.

- Le citochine spesso influenzano la sintesi di altre citochine, cioè una **cascata citochinica.** Si può determinare l'effetto biologico quando si somministra una determinata citochina e si osserva la risposta, attribuendo quella risposta alla citochina somministrata. Non è sempre così. In realtà la risposta osservata può essere mediata per il fatto che la citochina attiva altre cellule a produrre citochine che poi sono responsabili della risposta che osserviamo.

<u>Esempio:</u> Se noi somministriamo ad un animale **LPS** induciamo lo **shock.** Quest'ultimo in realtà è collegato ad una serie di citochine che sono indotte dall'LPS. All'inizio TNF, poi IL-1, IL-6, IL-8, IL-10. Si può capire qual è quella importante per gli effetti finali usando anticorpi neutralizzanti per le diverse citochine. Utilizzando anticorpi anti-TNF si blocca lo shock e possiamo capire chi è responsabile della cascata della risposta finale che LPS induce.

Lezione di Patologia generale e fisiopatologia clinica (sem2) del 12/3/2013 (1)

Lezione di patologia generale del 12.03.2013

Prof. Cassatella

Sbobinatore: Geoffrey Carli

Revisore: Mariachiara Mennucci

CITOCHINE

Continuiamo con le caratteristiche generali delle citochine:

PROPRIETA' DELLE CITOCHINE

Sinergismo:

Spesso le citochine influenzano l'azione di altre citochine, per esempio si possono avere interazioni sinergistiche (l'azione contemporanea di più citochine è molto maggiore della somma delle azioni delle singole. es: cit 4 e la cit5 trasferite assieme, sinergizzano nell' indurre igE switching) o antagonistiche (hanno funzioni opposte: una attiva e l' altra inibisce, es: l'interferone-γ inibisce la produzione di IgE, mentre la il4 la attiva.[Integrazione : I linfociti T helper (Th) si suddividono in due fenotipi Th1 e Th2. Nella fase iniziale della risposta immunitaria contro l'antigene viene deciso il destino funzionale (differenziamento) di una cellula T helper (CD4). Se un linfocita Th incontra l'antigene in presenza di IL-12 e/o IFN-γ (interleuchina -12, interferone γ) esso diventerà una cellula di tipo 1 (Th1), poiché generalmente IL-12 e IFN- γ sono prodotti da macrofagi e cellule NK attivati nelle prime fasi della risposta a patogeni intracellulari, è possibile comprendere perché tali risposte siano dominate da meccanismi messi in atto da cellule di tipo Th1. Al contrario se uno stimolo antigenico avviene in assenza di IL-12 o di IFn- γ la cellula Th utilizza IL-4 prodotta in maniera autocrina da Th stessa per differenziarsi in una cellula Th2, la quale produce IL-4 e IL-10. Queste due citochine svolgono un'azione inibitoria sulla differenziazione Th1, in modo da consentire una polarizzazione della risposta in senso Th2.] Questo si vede anche nelle diverse tipologie di reazioni, dove la polarizzazione verso un certo tipo di linfociti è dovuta alle citochine e all'ambiente, che contemporaneamente inibiscono la polarizzazione verso altri tipi.

Recettori:

Le citochine sono caratterizzate da un recettore specifico, che si trova sulla membrana della cellula bersaglio. È interessante notare che molto spesso l'affinità delle citochine per i propri recettori è bassissima, quindi molto spesso basta una variazione minima per variare la risposta.

- regolazione dei recettori:

Parecchi recettori sono costituiti da più catene, e spesso il loro numero influenza l'affinità di quel recettore. Ecco dunque un meccanismo che la cellula può sfruttare per modulare la sua risposta alla citochina: variando l'espressione di queste catene. (se l affinità è alta , la citochina lavora a basse concentrazioni). Questo è il meccanismo alla base della regolazione del recettore dell'IL-2. Abbiamo inoltre visto come nei linfociti T ai quali è stato presentato l'antigene, e che quindi si attivano, uno dei fenomeni che avvengono è l'aumento dell'espressione delle catene del recettore per l'IL-1β. Quindi a livello recettoriale non solo avviene la modulazione della risposta ad una determinata citochina, ma anche l'espressione, quindi l'affinità ed il pattern di espressione recettoriale, dei recettori può variare. Pattern variabile sulla faccia della stessa cellula a seconda dell'ambiente. Tutto ciò influenza la patogenesi delle malattie e la terapia. Vedremo come questa variazione può essere influenzata dalle citochine stesse. In questo modo è possibile ottenere una amplificazione positiva (feedback attivo)delle risposte.

Esempio in slide dei recettori per le chemochine, dove ogni tipo cellulare ha un pattern classico di espressione dei recettori di cellule a riposo, che con l'attivazione può variare durante la migrazione e portare le cellule a rispondere a chemochine che normalmente non provocano alcun effetto.Es TH1 è in grado di esprimere recettori di chemochine specifici diversi da Th2, tanto che questi sono usati come marcatori specifici.

Come si spiega il fenomeno del sinergismo delle citochine? Ci sono molti meccanismi alla base del sinergismo, uno di questi è la capacità di una delle due citochine che agiscono sulla cellula di stimolare l'aumento dell'espressione del recettore per l'altra citochina.

La maggior parte delle risposte cellulari alle citochine richiede la sintesi di mRNA e proteine(regolazione tramite induzione e modulazione genetica della traduzione, con tutti i meccanismi di regolazione che ne conseguono.)

Stimoli alla sintesi di citochine:

- riconoscimento dell'antigene presentato dai macrofagi;
- endotossine: PAMPs , LPS
- particelle fagocitabili, date dalla fagacitosi, in genere promuove l espressione di citochine infiammatorie e attivatrici di fattori di crescita
- Riconoscimenti di allergeni da parte di igE sui mastociti che attiva l aggregazione rapida di queste cellule, ma anche trascrizione genica d varie citochine (3, 4, 5, …)per modificare la risposta e reclutare cellule effettrici
- interleuchine. Es IL2 che attiva NK , uno dei segnali piu potenti per la produzione di interferone, o linfocitaT per i quali ad es la cit 2 attiva la 3 e altre.

Le citochine sono prodotte durante la fase effettrice e servono a mediare e regolare le risposte immuni naturale e specifica ed infiammatorie. Per es. le cellule NK producono INF-γ, che stimola i macrofagi a produrre IL-12 Questa a sua volta stimola l'attivazione delle cellule NK e quindi la produzione di INF-γ, creando un feedback positivo (circuito di amplificazione tra macrofagi e NK).Nell'immunità adattiva l'il12 quando gli viene presentato un antigene tramite IL2 determina la polarizzazione dei linfociti T sempre più specifizzati, agendo in maniera autocrina. I linfociti T Cd4 possono a loro volta a seconda dell' antigene o dell' ambiente produrrà interferone gamma o attiverà macrofagi o produrrà altre citochine che agiranno sui linfociti B per la produzione di anticorpi specifici o tramite IL2 attivare i CD8 per attivare i CLT citotossici, le cellule effettrici fondamentali dell' immunità cellulo mediata. (cfr. diapo 7).

Principali funzioni generali regolate da citochine: (slide 9)

- influenzare la proliferazione e maturazione di leucociti da parte del midollo osseo
- proliferazione e differenziazione cellule immunocompetenti (linfociti T e B)
- regolazione della funzione citocida proprie dei fagociti
- modulano funzione ed espressione genica nella flogosi
- regolazione di marginazione e migrazione dei leucociti attraverso l'attivazione delle integrine leucocitarie e l'espressione dei ligandi endoteliali: citochine antiifiammatorie, fattori chemotattici, chemochine
- regolazione di processi riparativi e danno tissutale
- modulazione delle reazioni sistemiche a diversi danni
- riconoscimento e distruzione di cellule tumorali o infettate da virus
- regolazione dei fenomeni allergici

Classificazione delle citochine:

- Interleuchine: citochine prodotte principalmente da leucociti e funzionanti da messaggeri tra gli stessi (le Il sono 38)
- Fattori di crescita: capaci di promuovere la proliferazione e la polarizzazione dei precursori delle cellule mieloidi e favoriscono al loro produzione da parte del midollo. Sono anche in grado di funzionare a livello delle cellule mature su cui hanno funzioni modulatorie
- Chemochine
- Interferoni (tipi 1, 2 e 3): azioni antivirale, antitumorale. attivano leucociti
- Citochine pro-infiammatorie: flogosi acuta e cronica, apoptosi, proliferazione cellule antitumorali, rimodellamento osseo
- TNF e simili: non solo nelle risposte immunologiche ma anche nella modulazione di apoptosi, proliferazione, antitumorale, e altre
- Colony stimulating factors: Nei fattori di crescita esistenti per ogni tipo cellule per indurre la maturazione della cellule e proliferazione
- Transforming growth factors: modulano attività (anche nei tumori)
- Neurotrophic factors:per differenziazione e proliferazione etc

(nb: l IL1 è chiamata anche "pirogeno endogeno", come anche la 6)

Possono poi essere classificate sulla base della struttura del recettore:

- I recettori delle citochine di tipo I mantengono delle strutture conservate a livello extracellulare e si avvalgono di un signalling intracellulare di tipo JAK-STAT
- I recettori delle citochine di tipo II rispondono agli interferoni e ai membri della famiglia dell'IL-10
- I recettori della famiglia TNF(anche loro utilizzano jak-stat) riconoscono i membri della famiglia TNF, utilizzano un signalling abbastanza specifico e attivano la via di NF-κB
- Recettori famiglia IL-1: signalling IRAK, somiglianza con TLR
- Recettori per chemokine: 7-transmembrana, legano proteine G
- Recettori che legano famiglia TGF (trasforming grouth factor)

Oppure si possono classificare i recettori sulla base della loro composizione:

i recettori multimerici generalmente sono composti da più catene ed in genere esiste una catena specifica che lega il ligando specifico(chiamata di solito alfa), mentre catene secondarie trasducono il segnale. La presenza di una catena comune recettoriale aiuta a capire come mai alcune citochine hanno funzioni biologiche simili. Per esempio i recettori della famiglia GM-CSF hanno una catena α specifica(low affinity) per la citochina ed una catena β invariante che si occupa del signalling (che quando si lega alla alfa ne fa aumentare il segnale)

- Recettori famiglia IL-6: (alcune con 3 altre con 4 catene) caratterizzati da catene specifiche alfa ed una catena comune, chiamata gp130, responsabile del signalling. Es: proliferazione velocissima nel mieloma -tumore delle plasmacell - linf B, mantenimento delle cellule embrionali pluripotenti, induzione delle proteine della fase acuta). Alcune contengono la catena LIFR (rif pagina 18 delle slide)

- Recettori che contengono la γ-chain(per Il 2, 4, 7, 9, 15, 21 citochine che agiscono sulle cellule linfoidi ed Nk) espressi da cellule linfoidi ed NK. Oltre alla γ-chain tutti si avvalgono del pathway JAK-STAT, in particolare tutti usano JAK3.

Esistono patologie genetiche ereditarie, chiamate nel complesso SCID, in particolare quelle legate al cromosoma X, in cui vi è un deficit accentuato della risposta immunitaria in quanto o non vi sono linfociti e cellule NK o non rispondono, il che comporta una grave immunodeficienza. Si è scoperto che per alcune di queste sindromi il deficit è spigato dalla mancanza della γ-chain o molecole del complesso JAK-STAT (cfr diapo 23-24). Quindi questi soggetti non possono rispondere alle citochine es: la 2 attiva linfociti T,la IL7 fondamentale per i precursori di linfociti B e T, la IL15 per la maturazione delle cellule NK

Se manca Jak 3 la patologia è meno grave

Famiglia recettori IL-12: citochine eterodimeriche:

IL12,formata da due catena p35 3 p40,insime fanno p70, ha un recettore con 2 catene il beta1 e beta2 trasmembrana; sono state scoperte la citochina 23, 27, 35 della stessa famiglia che condividono la cetena rettoriale ma anche diverse subunità nonché il signaling.(anche se hanno funzioni diverse e scollegate)

Tutti i recettori per questa famiglia quando attivati attivano cascate di signalling che in ultima fase portano a modificazione di fattori di trascrizione (nel citoplasma, post-traslazionali), solitamente mediante fosforilazione by chinasi, nel nucleo si legano a sequenze specifiche nel DNA e quindi modulazione dell’espressione dei geni bersaglio. (cfr. slide 28 per i tipi) Sono attivati vari tipi di recettori e di segnali e fattori di trascrizione che sono attivati. Nel nucleo o nel citoplasma ci sono recettori che attivano fattori di trascrizione, recettori per citochine che attivano fattori di trascrizione della famiglia stat, citochine che legano recettori che a livello del loro dominio intracitoplasmatico posseggono attività tirosin chinasica, e altri recettori come quelli della famiglia del tgf-beta che hanno un dominio intracellulare, che funziona come serin tirosin chinasi che va a attivare fattori di trascrizione bersaglio appartenenti alla famiglia snad. Ciascuno di questi rettori è comunque in grado di attivare diverse vie oltre queste.

Via JAK-STAT:

via importante implicata nella segnalazione in risposta da citochine, utilizzata dalle interleuchine tipo I. Quando la citochina si lega al recettore, determina il cross-linking delle catene recettoriali che possono trovarsi spaiate, dimerizzazione o eterodimerizzazione delle catene recettoriali che rende il recettore attivo. A questo punto arrivano le JAK che si agganciano a livello del dominio intracitoplasmatico (le Jak sono delle tirosin chinasi con azione catalitica di fosforilazione a livello della tirosina) che si autofosforilano. Le JAK fosforilate sono in grado di reclutare e fosforilare STAT che erano in stato inattivo nel citoplasma. STAT fosforilate(in tirosina) dimerizzano o eterodimerizzare con altri membri della famiglia stat, traslocano nel nucleo, si legano alle sequenze

specifiche del promotore ed attivano la trascrizione di geni bersaglio relativi ad una determinata citochina. Esistono 4 JAK , costitutive (con diversi domini che ne determinano la funzioni, andamento e attivazione, conosciamo quali jak rispondono alle varie citochine reclutate da rispettivi recettori) ed inducibili. (cfr slide 31-32) (per specifiche risposte cfr. diapo 34).Essendoci solo 4 jak,la specificità sta nel tipo di cellula, dalla complessita delle vie di trasduzione .

IMPORTANTE slide pag 32

Ci sono invece 6 tipi di STAT o delle isoforme(cfr. diapo 34). Ne conosciamo la attivazione specifica in funzione dei vari tipi di tipi citochine. Il fenotipo dei topi knok out aiuta a capire la specificità di queste vie.Per esempio STAT1 è un fattore di trascrizione fondamentale per l'attività antivirale degli interferoni di tipo primo o secondo.. STAT2 è attivato solo dal tipo primo e non dal secondo. IL-10 e la IL6 (della famiglia gp130)attiva STAT3. Le citochine della famiglia della beta-chain attiva le STAT5 o A o B.   Per conoscere i ruoli e le specificità si utilizzano i topi knockout. (vari esempi da diapo 34- 35). La citochina 12 è una delle poche citochine che attiva STAT4, la 4 è una delle poche che attiva STAT6, il topo knok aut per stat 4 ha uno sviluppo difettoso della maturazione dei linfociti th1, ugual cosa parallela, sta6 per th2, tradotto : stat6 è fondamentale per i th2 etc..

L'importanza di questa via di trasduzione della jak-stat è dimostrata dal fatto che esistono vari sistemi di regolazione che servono a modulare o spegnere il segnale(modulazione negativa da parte delle medesime citochine che attivano la via):

- defosforilazione in tirosina ad opera di apposite tirosin fosfatasi di fatt di trascriz o altre proteine bersaglio della via(attivate dalle stesse citochine che attivano la via jak-stat): SHP1, SHP2, PTP1B, CD45
- proteine SOCS (suppressor of cytokine signalling): sintetizzate ex novo in risposta all'azione di una citochina, spengono la via attivata dalla citochina che le ha prodotte (feedback negativo). Importanti per il controbilanciamento delle vie jak-stat in modo relativamente specifico
- fosfatasi nucleari
- PIAS: inibitori nucleari costitutivi. Si trovano nel nucleo della cellula e possono attivarsi quando le stat attivate entrano nel nucleo e si legano ad esse disattivandosi.
- forme troncate di STAT

In diapositiva 38 raffigurata la via di regolazione delle fosfatasi: la citochina lega il recettore , attiva la via stat di trascrizione, che può essere inibita da tirosin fosfatasi come cd45,gia presente sulla plasma membrana di quasi tutti i leucociti, oppure delle fosfatasi citoplasmatiche che vengono reclutate.

SOCS:

In diapositiva ce ne sono 7 con varie isoforme: la citochina lega il recettore attiva la via jak stat propria, stat si dimerizza, si fosforila, va nel nucleo, attiva la trascrizione dei geni bersaglio di questa citochina; tra i geni bersaglio attivati dalla citochina spesso ci sono anche geni SOCS. I loro

prodotti vanno ad interferire con la via JAK-STAT e quindi hanno un’azione di feedback negativo. Posso legare jak o stat o inibire la fosforilazione del sistema. Possono essere stimolate anche da altri segnali (recettori diversi), per es. TLR4 (confronta diapo 42-43). Fenomeni sinergistici. I recettori si controllano tra di loro attraverso proteine come le SOCS che modulano le risposte

Hanno un’importante azione di modulazione nell’attivazione e differenziazione dei sottotipi di linfociti T (cfr diapo 44).

PIAS:

Le PIAS sono 4, si trovano già nel nucleo e possono intervenire nello spegnere il controllo trascrizionale delle proteine STAT che può essere sia positivo che nagativo. Non si sa come sia il loro funzionamento a livello delle STAT.

Ci sono diverse patologie ereditarie legate alla via jak-stat

NF-κB:

Un’altra via di trasduzione è il sistema NF-κB. Esso è attivato da vari segnali extracell, tra cui TLR, danno ai tessuti, IL1R e citochine proinfiammatorie (apoA e TFNR). È fondamentale per la risposta infiammatoria in quanto è in grado di attivare la trascrizione di molteplici geni coinvolti nell’infiammazione , fattori della coagulazione, citochine, chemochine, molecole di adesione, molecole effettrici cioè enzimi come la NO sintasi2, cicloossigenasi2 e molecole costimolatorie(cfr. diapo 47).

Via TNFalfa receptor e IL1 R(cfr diapo 48)attivano una cascata di trasduzione: I segnali determinano l’attivazione re la complessazione di una piattaforma di proteine adattatrici e chinasi che convergono ad attivare le chinasi IκB. Queste vanno a fosforilare il complesso citoplasmatico inattivo che contiene membri della famiglia NF-κB complessati con vari inibitori IkB alfa , beta etc... La fosforilazione lo attiva facendo staccare l’inibitore, l’ ikb fosforilato viene poi ubiquitinilato e degradato. Si liberano i segnali di localizzazione nucleare di NF-κB che trasloca quindi nel nucleo e promuove la trascrizione dei suoi geni bersaglio.

Il complesso meglio caratterizzato come proinfiammatorio è p65/p50,(la nfkb family è composta da diverse unità –tra cui p52, cRel,RelB, (cfr diapo 49) che complessano tra di loro a seconda della cellula e del segnale che ricevono, possono avere funzioni simili o molto diverse. Es p50/p50 sono inibitori e si legano ai promotori dei geni infiammatori e li blocca) che è il complesso che rappresenta la via definita di attivazione classica di NF-κB (cfr. diapo 50).

I geni indotti dalla NFkB ? proteine infiammatorie(cfr diapo 50).

La via alternativa di attivazione di NF-κB (cfr diapo 51) che implica l attivazione di p100 (precursore della p52) e RelB è attivata da alcune citochine come molti dei membri della famiglia dei TNF: LT-β, BAFF, CD40L.

Vi sono inoltre numerosi inibitori di NF-κB: gli IκBs (cfr diapo 52).Controllo di attivazione anche a livello nucleare.

Meccanismo antinfiammatorio dei glucocorticoidi:

farmaci potentissimi antiinfiammatori, immunosoppressivi molto efficaci . Funzionano con meccanismi di inibizione del sistema NF-κB tramite inibizione diretta del complesso attivo p50/p65 da parte del recettore nucleare dei glucocorticoidi da una parte e dall' altra (i glucocorticoidi agiscono su recettori nucleari che si legano alla sequenza bersaglio insieme a altre proteine e attivano espressione genica, tra i geni attivati dai glucocorticodi c'è IKB: inibitore citoplasmatico del complesso di NfKb) tramite aumento dell'espressione dell'inibitore citoplasmatico di NF-κB.

Quindi favoriscono la formazione dell' inibitore che mantiene NFKB inattivo e interagisce con il complesso attivo e lo blocca.

Micro RNA:

18,20,21 nucleotidi ,i microRNA sono in grado di controllare l'espressione genica a livello post-trascrizionale si legano a sequenze 5primo di mRNA inibendo la traduzione o favorendo la degradazione dell' mRNA bersaglio.

Impediscono la sintesi di una proteina relativa a un mRNA bersaglio o ne favoriscono al degradazione, implicati nella regolazione dell espressione genica, possono avere effetto positivo o negativo a seconda di cosa vanno a controllare. Hanno importanti ruoli nei tumori, La alterazione di micro RNA favorisce o sfavorisce l' espressione di oncogeni o di oncosoppressori(cfr diapo 55).Fino ad oggi sono stati classificati 800 Micro RNA. (cfr diapo 57) fa vedere che il risultato finale è dovuto ad una inibizione di un inibitore con incastro di regolazioni

(cfr diapo 58)Riassunto delle principali vie di regolazione.

Recettori solubili citochine:

Un altro importante meccanismo di regolazione di azione di una citochina avviene a livello recettoriale che controlla le risposte delle varie citochine perché i recettori possono essere rilasciati in forma solubile e riconoscere la cellula bersaglio (receptor shedding).Il recettore rilasciato (degradati da enzimi di superfice) lega il ligando sequestrandolo e quindi inibendolo: esistono recettori in grado di riconoscere a citochine ma non sono in grado di segnalare e quindi bloccano il segnale sequestrando la citochina.(I TNFR sono rilasciabili) Esistono recettori antagonisti di recettori naturali. Alcuni virus sfruttano questo sistema per tentare di rendere inefficaci i sistemi antivirali dell'organismo.

Lezione di Patologia generale e fisiopatologia clinica (sem2) del 13/3/2013 (1)

PATOLOGIA professore: Minuz
SBOBINATORE: Cristina Chiamenti 13/03/2013

Il cuore è il principale determinante del flusso ai tessuti.
Il cuore è essenzialmente una pompa, ha una funzione fisiologica semplice e tutto sommato è semplice anche dal punto di vista della meccanica.
Per il momento analizziamo la funzione del cuore di sinistra, essendo quella che determina le condizioni del circolo sistemico. Analizzeremo invece la porzione di destra e le problematiche relative al circolo polmonare e al cuore destro, quando parleremo delle disfunzioni polmonari .
Pertanto, ora quando parleremo di ventricolo e atrio ci riferiremo al cuore sinistro.
GRAFICO CICLO CARDIACO
Inizia la contrazione cardiaca, aumenta la pressione, la quale è determinata dalla spinta e dall'ostacolo al flusso dato dal riempimento vascolare, poi la valvola aortica si chiude, la pressione decresce si torna ad un valore prossimo allo zero, quindi si apre la valvola mitrale e si ha il riempimento del ventricolo di sinistra. In questa fase, si ha il volume che tende a crescere e la pressione che tende a mantenersi costante, salvo l'ultimo periodo del riempimento ventricolare.
Quindi, quello che avviene è un passaggio da elevati valori pressori interventricolari durante la sistole, a valori prossimi allo zero durante la fase di riempimento diastolico.
Questa capacità di variare le pressioni e i volumi, l'una connessa all'altra, è tipica della struttura miocardica. Essenzialmente richiede due cose
: - la capacità di sviluppare una contrazione e quindi di generare un lavoro
- la capacità di rispondere ad una variazione di volume (che avviene in diastole) senza offrire sostanziali resistenze al flusso ematico in entrata.
Quindi la prima corrisponde ad un elevato grado di contrattilità e la seconda ad un elevato grado di distensibilità, di compliance. Queste due caratteristiche rendono il cuore efficiente. La variazione di una delle due peculiarità è sufficiente per determinare un grado di disfunzione delle proprietà contrattili e di riempimento del cuore, che prelude alla condizione di scompenso cardiaco.
Riassumendo, le due caratteristiche principali da tenere presente sono il fatto di poter sviluppare una forza adeguata, e quindi una contrazione che abbia le caratteristiche di forza sufficiente per generare lavoro; mentre la seconda è, una volta terminato questo, un rilassamento delle fibre che permetta una dilatazione delle fibre della cavità cardiaca, del ventricolo, per raccogliere il sangue senza opporre resistenza, quindi senza incremento di pressione.
CONTRATTILITà MIOCARDICA (1)
La forza contrattile in una certa misura è legata anche ad una lunghezza ottimale delle fibre. Questo meccanismo ha una spiegazione biochimica, infatti è legato ad un aumento del Ca++ intracellulare che determina la contrazione delle miofibrille e quindi un accorciamento dei sarcomeri. Una distensione determina un' ottimale contrazione, una sovra distensione non determina un ulteriore guadagno in termini di forza contrattile. In questo, c'è il concetto intrinseco di esauribilità della capacità di adattamento dilatativo della camera cardiaca. Pertanto, un ottimale riempimento

diastolico si accompagna ad una maggiore forza di contrazione, e una sovra distensione durante la fase diastolica non determina un ulteriore guadagno.

CONTRATTILITà MIOCARDICA (2)

Il secondo determinante è la disponibilità di Ossigeno. Un cuore può contrarsi, può sviluppare forza, se ha a disposizione ossigeno, quindi una adeguata architettura dal punto di vista anatomico che permetta una nutrizione del tessuto miocardico che sia maggiore in caso di un aumento di lavoro e dia un adattamento del microcircolo. Tutte le condizioni che determinano o un riarrangiamento strutturale, e quindi il microcircolo sia alterato (ad esempio nell' ipertrofia o in malattie che portano a degenerazione della struttura miocardica), oppure un basso flusso per un ostacolo meccanico (ad esempio una placca arteriosclerotica senza comunque arrivare ad una vera e propria ischemia, ma solo ad una riduzione del flusso), avranno una ripercussione sulla capacità di sviluppare forza contrattile, effetti negativi sulla velocità di accorciamento e per certi aspetti sulla capacità di distendersi in diastole, quindi sulla compliance.

DETERMINANTI DELLA CONTRATTILITà

La depolarizzazione della membrana è lo stimolo per l'apertura dei canali del Ca++, ulteriore Ca++ proviene poi dal rilascio del reticolo sarcoplasmatico , determinando così la contrazione per scorrimento delle fibre di actina e miosina, e questo può avvenire grazie al fatto che c'è molta disponibilità energetica(ATP); una volta iniziato il recupero del calcio dal RE avremmo la fine della contrazione e l' inizio della fase di rilassamento.

LEGGE DI FRANK-STARLING

Esiste una relazione necessaria che lega pressione e volume, questa relazione è definita dalla Legge di Frank-Starling: un'ottimale distensione delle fibre muscolari cardiache garantisce la capacità di determinare la forza in fase di contrazione sistolica. Questa relazione tende ad essere lineare per una certa fase (quindi tanto più aumenta il volume, tanto più aumenta la pressione), poi c'è l'appiattimento della curva.

Abbiamo visto la stessa cosa per le cellule muscolari lisce dei vasi, dove una sovra distensione del vaso determina un'incapacità di generare contrazione, anche se in quel caso la mancanza di una stretta architettura delle fibre e la sostanziale dipendenza da meccanismi di contrazione (che sono originati molto spesso da segnali che portano alla generazione di chinasi, anziché da un meccanismo dipendente dalla depolarizzazione), comporta un'attivazione tonica della muscolatura. Quindi il quadro è completamente diverso: nel cuore abbiamo una contrazione determinata dalla ritmica apertura e chiusura dei canali del Na+ e del Ca++ e dalla liberazione del Ca++ intracellulare dal reticolo sarcoplasmatico, poi la conseguente chiusura dei canali e il recupero dal RE del Ca++ portano ad una cronica ritmicità del processo.

LAVORO CIRCOLATORIO

Il primo fattore che modula questo processo è l'entità del riempimento della camera cardiaca. Il lavoro cardiaco è determinato dalla ritmicità di queste contrazioni e dalla quantità di sangue che viene spinto in avanti nel circolo sanguigno (che è enorme nell'arco delle 24 h:8000 L di sangue al giorno) ed è modulabile attraverso variazioni del volume diastolico: - se ho un alto volume diastolico, avrò una maggiore capacità di dare pressione;

-se invece agisco in modo negativo sulla capacità contrattile o sulla distensibilità, perdo capacità di generare volume di riempimento oppure spinta in avanti, perché viene a cadere la pressione oppure viene meno la capacità di riempimento.

DETERMINANTI DELLA FUNZIONE CARDIACA

In termini di funzionalità, di portata cardiaca, di quantità di lavoro generato come spinta in avanti del sangue, ho una serie di variabili che posso considerare:

1) CONTRATTILITA': dev'esserci una forza contrattile adeguata per permettere lo svuotamento della camera cardiaca e per vincere le resistenze vascolari periferiche, quindi generare una pressione che superi, nella fase di contrazione, quella presente all'interno del lume vascolare.

2) DISTENSIBILITÁ: se non c'è un adeguato riempimento diastolico la contrazione subisce una riduzione. La distensibilità è determinata oltre che dalle caratteristiche intrinseche della parete vascolare (es. un ipossia può determinare una minore distensibilità della camera cardiaca), anche dalla quantità di sangue che torna al cuore, se non ho un adeguato riempimento della camera cardiaca, anche se avessi un'elevata compliance essa resta vuota, poco distesa, e la contrattilità sarà minore.
3) Quest'insieme di distensibilità delle pareti del cuore e riempimento sanguigno delle camere cardiache, determina il PRECARICO. Un adeguato precarico è dato da un buon ritorno sanguigno e da un'elevata distensibilità.
4) Il POSTCARICO è la resistenza offerta al flusso in avanti, determinata dalle RESISTENZE VASCOLARI PERIFERICHE. Ovviamente ci sono delle eccezioni (altre cause che determinano il postcarico oltre le resistenze periferiche NdR) ad esempio se ho una valvola aortica che non si apre bene, cardiopatia ipertrofica che determini un'ostruzione alla fase di eiezione del sangue. La resistenza al flusso il più delle volte è generata dalle resistenze del circolo sistemico dove si determina una condizione per la quale il postcarico non è ottimale. Paradossalmente, anche una riduzione molto marcata delle resistenze vascolari periferiche può determinare una inefficienza cardiaca, perché se ho una caduta di pressione, come nelle massive vasodilatazioni e in condizioni di shock anafilattico, la contrattilità cardiaca viene mantenuta, ma una spinta in avanti determina un flusso intermittente; quindi il flusso viene modulato dalle RPT e viene determinata una condizione di inefficienza del circolo. Il postcarico è una condizione determinata dalle RPT ma è necessaria per la funzione circolatoria, (una buona pressione è necessaria per determinare un flusso nel microcircolo), sia un eccesso in alto che una caduta verso il basso delle resistenze vascolari periferiche possono determinare una condizione di inefficienza circolatoria, influendo anche sulla funzionalità cardiaca (per esempio di basse RPT dato da insufficienza valvolare aortica che porta ad un reflusso di sangue in diastole).
5) FREQUENZA: L' efficienza cardiaca richiede che ogni sistole si ripeta nel tempo con intervalli adeguati per avere un buon riempimento delle camere cardiache e un numero di atti sufficienti per determinare un flusso circolatorio in periferia adeguato, quindi per avere una portata cardiaca adeguata. Perciò, la frequenza cardiaca è estremamente importante perché determina nel tempo la portata cardiaca. A parità di altre condizioni, se io riduco la frequenza cardiaca mi aspetto una buona distensione in diastole, (anzi ottimale), una buona forza contrattile, ma essendo basso il numero di contrazioni per unità di tempo la quantità di sangue che mi giunge in periferia sarà ridotta. Se avessi 30 battiti al minuto, avrei una perdita di flusso per totale incapacità di adattare il flusso alle necessità metaboliche; quindi per una minima attività fisica in queste condizione avrei una condizione di ipoperfusione. Se io aumento la frequenza oltre certi limiti paradossalmente avverrebbe la stessa cosa: la portata non incrementerebbe adeguatamente o tenderebbe a ridursi, perché l'intervallo di tempo in diastole si accorcia e quindi io ho un riempimento minore. E' quello che accade in condizioni di aritmie ipercinetiche, come la fibrillazione atriale o peggio la fibrillazione ventricolare, in cui le frequenze di risposta sono molto elevate, il tempo di riempimento è molto basso, la gittata si riduce; quindi anche se aumenta il numero di atti di contrazione non c'è il tempo per il riempimento e quindi la gittata complessivamente si riduce. Un aumento della frequenza cardiaca è un esperienza comune: durante una corsa la frequenza aumenta come adattamento fisiologico ad una aumentata richiesta metabolica, tuttavia in questo caso abbiamo anche un miglior riempimento diastolico, perché la pompa muscolare è in atto, e perché gli aspetti vascolari che sono implicati nell' esercizio fisco(vasodilatazioni) che permette un maggior afflusso di sangue ai distretti vascolari implicati nell'esercizio, quindi si ha un circolo ipercinetico ma con un sostanziale miglioramento dei parametri di riempimento delle camere cardiache. Ovviamente anche questo avviene entro certi limiti, poiché anche qui c'è una soglia sotto una certa frequenza, raggiunta la quale non si ha più capacità di generare forza, ci si arresta e compare un deficit di irrorazione dei tessuti; in un soggetto poco allenato c'è un aumento della frequenza maggiore di un soggetto allenato e quindi un minor adattamento della

funzionalità cardiaca anche nell'ambito della fisiologia. A noi interessano però patologie di alterazioni del ritmo e della frequenza cardiaca che possono determinare gravi alterazioni della portata cardiaca.
Quindi la funzione diastolica determina "l'ottimabilità" del precarico, la funzione sistolica determina "l'ottimabilità" del postcarico e questo determina l'adattamento funzionale cardiaco .
Se vengono alterate queste funzioni avremmo un mal adattamento funzionale cardiaco alle necessità dell'organismo. Quindi riassumendo due parametri determinano il precarico, il volume di riempimento dato dal ritorno venoso e la capacità caratteristica del miocardio di distendersi, il postcarico richiede capacità di contrazione e dall'altra ottimali valori di resistenze vascolari periferiche.
Bisogna tenere presente alcuni
parametri:
- il volume di eiezione (stroke volume) o volume sistolico è dato dal volume telediastolico-volume
telesistolico.
– frazione di eiezione che sarebbe il rapporto tra il volume di eiezione rispetto al volume telediastolico. Questo rappresenta un valore estremamente importante come riferimento alla funzionalità miocardica in fase sistolica. Se ho una bassa capacità di spingere il sangue in fase sistolica, avrò la frazione di eiezione che si riduce perché si è ridotto il volume sistolico; se ho una sovra distensione delle camere cardiache, ad esempio per insufficienza valvolare, aumenta il volume di riempimento telediastolico e il rapporto si riduce se non c'è un adeguamento anche del volume
sistolico.

-L'output, la portata cardiaca è la moltiplicazione dei volumi di eiezione per atti di contrazione nell' unità di tempo, ovvero il minuto. La portata cardiaca rappresenta il lavoro cardiaco nell' unità di tempo,ed è il parametro di riferimento per la funzione circolatoria e la valutazione dell' ossigenazione ai tessuti. L'adattamento funzionale che è attuato mediante variazione delle resistenze periferiche, della frequenza cardiaca e della contrattilità, fa si che la portata cardiaca abbia un alto margine di variazione in condizioni fisiologiche, per cui può moltiplicare x5 anche in condizioni fisiologiche. L'indice cardiaco è lo stesso concetto riferito alla superficie corporea.
PORTATA CARDIACA E FLUSSI DISTRETTUALI
Abbiamo visto che in attività fisica è possibile ottenere una buona ossigenazione ai tessuti in attività attraverso l'aumento dei flussi distrettuali. Quindi considerando che un aumento della funzionalità miocardica associato ad un adeguamento delle resistenze periferiche totali, può portare ad un aumento di cinque volte della portata cardiaca, io posso considerare un aumento fino a 20 volte dei flussi distrettuali dei tessuti sottoposti ad attività; ovviamente siccome è moltiplicato per 5 il flusso di sangue che arriva in periferia ci dev'essere uno shift: quindi in alcuni tessuti avrò un aumento molto consistente, ad esempio nei tessuti muscolari implicati nell'attività fisica, in altri, probabilmente, una riduzione di flussi distrettuali. Bisogna fare una distinzione tra la valutazione complessiva e la distribuzione locale, che è determinata da fattori locali. Il cuore deve lavorare di più in queste condizioni quindi la circolazione coronarica incrementa di flusso.
MECCANISMI DI INSUFFICIENZA CARDIACA
Questa capacità di adattamento del cuore alle necessità metaboliche, che può aumentare fino a cinque volte il suo lavoro può essere definita come riserva funzionale cardiaca. Questo concetto di riserva funzionale si usa anche per la funzionalità renale e quella respiratoria , e corrisponde ad un adattamento in più o in meno per adattare l'organo alle necessità dell'organismo. La funzione circolatoria è molto ampia, quindi l'adattamento è anch'esso ampio senza per questo uscire dai parametri normali fisiologici. Se i parametri che regolano la funzionalità cardiaca (frequenza, distensibilità ecc..) si alterano, la riserva cardiaca tende a ridursi. Una riduzione della riserva del cuore fa si che possa esserci un adattamento inefficiente in condizioni d esercizio fisico; questo non

si traduce immediatamente in una condizione di disturbo funzionale maggiore,in condizioni di riposo si può non avvertire minimamente questa riduzione della riserva cardiaca, ma si ripercuote solo nel momento in cui aumenti le sue esigenze metaboliche, quindi in condizioni di attività,non in condizioni di riposo. Tutto ciò porta ad una condizione di ipossigenazione e di malnutrizione dei tessuti, quindi non si è in grado di svolgere il lavoro richiesto. L' esaurimento della riserva funzionale è un fatto che può precedere le manifestazioni più evidenti di quello che si chiama lo scompenso cardiaco, cioè l'insieme di manifestazioni e di adattamento funzionale che caratterizzano un cuore inadeguato a svolgere le funzioni di mantenere un circolo sistemico e di nutrizione dei tessuti. Questo avviene nonostante si instaurino dei meccanismi di compenso. Nello scompenso cardiaco è intrinseco il concetto che la riserva cardiaca ridotta e che allo stesso tempo che questa è manifestamente inadeguata alle necessità metaboliche. In un soggetto giovane e sportivo con elevata attività metabolica si manifesterà prima che in un soggetto che ha minori necessità metaboliche dove è possibile che sia mascherata. Quindi bisogna tener presente che la diminuzione della riserva funzionale ,ovvero l'insufficienza cardiaca, può precedere di gran lunga le manifestazioni fisiopatologiche tipiche dello scompenso cardiaco.
Esempio: Se un individuo con un'ipertensione arteriosa, con una tecnica molto semplice anche di ecocardiografia cioè con una visualizzazione della struttura e funzionalità del cuore, possiamo cogliere degli aspetti come l'ispessimento della parete, una minore distensibilità in diastole che precedono ogni manifestazione clinica dello scompenso cardiaco. Quindi la condizione di ridotta riserva funzionale può essere una situazione molto precoce, che può essere colta attraverso vari metodiche diagnostiche che sfruttano i concetti di fisiopatologia per l'analisi della disfunzionalità cardiaca che può precedere di gran lunga le condizioni di scompenso cardiaco. (definizione sulla slide scompenso cardiaco).
SCOMPENSO CARDIACO (DEFINIZIONE DA SLIDE)
Complesso meccanismo fisiopatologico di adattamento conseguente all'inadeguatezza della funzione cardiaca nel quale coesistono:
• aspetti strettamente cardiaci (rimodellamento e di alterazione della struttura cardiaca che posso essere l'elemento iniziale dello scompenso oppure l'elemento adattativo secondario) legati al meccanismo del danno miocardico
• aspetti emodinamici periferici
• meccanismi di risposta neuro-ormonale (come ad esempio l'attivazione adrenergica che accompagna tutte le fasi dello scompenso cardiaco)
DOMANDA STUDENTE: quali sono le cause di un abbassamento della riserva cardiaca di un individuo?
Alterazione della funzionalità cardiaca in sé .
Ipertensione: il cuore lavora di più nel tempo; ipertrofia: che determina un abbassamento della riserva. Anche la semplice corsa che porta ad un innalzamento della pressione riducela riserva funzionale. Molto spesso in mezzo a questi meccanismi c'è il rimodellamento cardiaco in fasi avanzate. A
spetti emodinamici periferici che possono essere precedenti o secondari, come ad esempio una vasocostrizione che si accompagna ad uno scompenso cardiaco.
Aspetti neuronali tipici come l'attivazione adrenergica che è sempre presente, ma potrebbe essere anche un fattore causale.
Quello dello scompenso cardiaco è un sistema con una certa circolarità, che porta come una spirale ad un deficit di funzione sempre maggiore. Ci sono fattori causali e meccanismi di adattamento e quest'ultimi sono, molto spesso, loro stessi causa di progressione dell'insufficienza. Questo dello scompenso cardiaco è paradigmatico della fisiopatologia: meccanismi di adattamento che sono causa loro stessi della progressione della malattia, non si raggiunge mai l'equilibrio.
ADATTAMENTO ALL'INSUFFICIENZA
CARDIACA:
1^ meccanismo: AUMENTO DEL VOLUME DI RIEMPIMENTO

Immaginiamo di avere una condizione in cui sia richiesto al cuore di lavorare sempre a livelli superiori al suo limite, anche in questo caso si parla di una situazione fisiologica: se io comincio un'attività fisica posso grazie al ritorno venoso che aumenta avere un'ottimale distensione e quindi una forza contrattile che tenderà ad essere maggiore. Questo adattamento è sempre presente, ed è una risposta puramente fisiologica. Se io ho per qualche ragione, un deficit di contrattilità (non indaghiamo adesso le cause), questo meccanismo sarà quasi automaticamente sempre operante, cioè una maggiore distensione e un maggiore riempimento finché la forza contrattile è adeguata non si ripercuote in nulla di particolarmente significativo .
2^ meccanismo: ATTIVAZIONE DEL SIMPATICO
Un secondo aspetto sempre presente in una condizione in cui comincia a ridursi la riserva funzionale, e comincia a manifestarsi una condizione di scompenso cardiaco, è l'attivazione adrenergica, che non è altro se non la risposta ad una condizione di basso riempimento arterioso. Se voi avete, per qualche ragione, un iniziale incapacità del cuore di generare una forza, per cui lo stroke volume si è ridotto e la portata cardiaca si è di conseguenza ridotta, io avrò a livello dei grossi vasi e del cuore una minor distensione. I recettori di stiramento: barocettori ad alta pressione che sono localizzati nei grossi vasi che escono dal cuore, e i recettori di stiramento che sono all'interno del cuore, percepiscono e trasmettono questo segnale. Viene così attivato il centro cardiocircolatorio determinando una risposta adrenergica con l'aumento del rilascio di noradrenalina, quindi una vasocostrizione in periferia ma anche un aumento della contrattilità miocardica , e un aumento della frequenza cardiaca. Risposta generalizzata che si attua anche nel passaggio dalla posizione di clinostatismo a ortostatismo, è una risposta fisiologica, durante un esercizio fisico intenso oltre alle variazioni dei parametri di flusso gran parte dell'incremento della frequenza cardiaca deriva dalla risposta
adrenergica.
Quindi l'aumento della frequenza cardiaca, l'aumento della contrattilità attraverso l'aumento dell'attività adrenergica è sempre presente quando si riduca la riserva funzionale cardiaca e si deva far fronte ad un incremento, anche modesto, del lavoro cardiaco per aumentate necessità metaboliche. Quindi afferenze al nucleo del tratto solitario
DOMANDA STUDENTE: PRIMA FORMA DI ADATTAMENTO? COM'è ATTUATA?
La prima forma di adattamento è la distensione ottimale delle camere cardiache in diastole. Se tu hai un aumento del lavoro cardiaco questa è la risposta funzionale, se tu hai una riduzione della riserva funzionale questo si attua prima. In pratica quello che accade durante lo scompenso è che l'organismo si comporta come se fosse sottoposto ad un lavoro maggiore per necessità metaboliche maggiori, in realtà quello che scende è la capacità del cuore di adattarsi alle normali necessità dell'organismo. Quindi il meccanismo di adattamento attraverso un maggiore riempimento, quindi una maggiore distensione delle camere cardiache, è dovuta al fatto che i flussi sanguigni vengono mantenuti e quindi viene generata un volume maggiore e una pressione maggiore. In realtà quello che si genera è una maggiore tensione di parete, ed è quello che poi determina a lungo termine la dilatazione delle camere cardiache cronica, sostanzialmente aumenti la pressione e i volumi durante la fase diastolica.
DOMANDA: è DETERMINATO DA UN MAGGIOR RITORNO VENOSO? L'adattamento funzionale in attività fisica è determinato in buona parte dall' elevata distensibilità e dall'aumentato ritorno venoso. Quello che avviene nello scompenso cardiaco è una fase più avanzata, maggior volume e una maggior pressione nella fase diastolica, il meccanismo per cui questo avviene è legato al fatto che la parete è un po' più rigida ed aumenta soprattutto il volume che resta nella camera cardiaca al termine della sistole, sostanzialmente tende a ridursi la frazione di eiezione. Sommando questi due parametri si sposta la curva ottimale per cui in diastole si ha maggior volume e maggior pressione e questo è aspetto più caratteristico dello scompenso sistolico ma anche di quello diastolico.
Nella fase iniziale dello scompenso cardiaco trovano un loro ruolo adattativo anche i recettori a bassa pressione che sentono lo stiramento delle strutture vascolari prossime al cuore. Una maggiore

pressione e volume a livello del cuore di destra determina una risposta tachicardizzante e vasodilatatrice a livello del circolo periferico. L'attivazione dei recettori bassa pressione è presente fisiologicamente quando da in piedi ci si distende, allora in una condizione di scompenso cardiaco che in questo caso dev'essere uno scompenso che implichi anche il cuore di destra, quindi una fase relativamente più avanzata, i recettori a bassa pressione sono implicati contribuendo anch'essi alla tachicardia. Quando il cuore comincia ad essere inadeguato nella sua capacità di generare volumi di eiezione e di generare portata cardiaca, lo stiramento nei vasi dei recettori ad alta pressione segnano meno traffico alterato, si ha un'inibizione dell'attività del vago si ha un'attivazione simpatica per cui si ha tachicardia ,aumento dell'inotropismo, e una vasocostrizione periferica. Questo aspetto adattativo del sistema adrenergico è presente abbastanza precocemente in tutta la storia evolutiva nel tempo nelle condizioni di insufficienza cardiaca, e la accompagna sempre fino alla fineà un cuore insufficiente subisce poi nel tempo gli effetti che determinano su di esso elevati livelli stimolazione adrenergica.
Quindi il primo meccanismo è l'adattamento funzionale,parafisiologico, il secondo meccanismo di adattamento è l'aumento dell'attività adrenergica. Finalisticamente quest'ultimo è un buon meccanismo il cuore poco efficiente modifica la sua soglia di risposta agi stimoli, quindi aumenta la contrattilità, aumenta la frequenza, mantengo un riempimento vascolare ottimale anche in presenza di flussi ridotti per cui potenzialmente sembra essere l'ideale risposta funzionale per mantenere la funzionalità cardiaca.
In realtà i concetti sono completamente rovesciati perché questo adattamento che passa attraverso un aumento del lavoro cardiaco attraverso una stimolazione sulle arterie periferiche, sul tessuto miocardico attraverso stimolazione adrenergica è un dei meccanismi di progressione del danno miocardico e del danno vascolare, infatti comporta nel tempo un progressivo incremento delle resistenze vascolari periferiche e una riduzione più rapida della funzionalità cardiaca che consegue ai processi di rimodellamento che accompagnano lo scompenso cardiaco. Paradossalmente da fattore che per molti decenni è stato considerato un meccanismo protettivo nei confronti dello sviluppo dello scompenso cardiaco, è diventato obbiettivo terapeutico per cui bloccare l'attività adrenergica rientra nelle tappe iniziali del trattamento dello scompenso cardiaco. In termini strettamente finalistici e funzionali per breve periodo l'attività adrenergica è paradossalmente un beneficio, perché aumento la capacità di sviluppare forza contrattile (a parità di distensione delle fibre), riduco la velocità di accorciamento ,aumento quindi il lavoro cardiaco che posso generare. Questo vale in fisiologia (Es. esercizio fisico), ma nel tempo questo è uno dei meccanismi di progressione del danno cardiaco e vascolare.
EFFETTI STIMOLAZIONE ADRENERGICA
Attraverso un aumento dell'AMP ciclico ,determina una maggiore disponibilità di calcio libero citoplasmatico che determina poi una contrazione delle fibre muscolari più rapida, per cui aumenta la contrattilità e aumenta il cronotropismo.
Uno degli aspetti negativi dell'attività adrenergica eccessiva è che si determina un cronico incremento del tono vasocostrittivo in periferia, anche questo finalisticamente è un bene perché se i flussi tendono a ridursi, mantenere una pressione di riempimento vascolare più elevata determina (come nelle correnti elettriche) un maggior differenziale di pressione quindi possibilità di mantenere un flusso periferico adeguato (anche se in 'flussi' non lo sarebbe, lo è in pressioni). Tuttavia una continua stimolazione adrenergica è causa di rimodellamento vascolare e quindi già questo è un problema, in più aumenta necessariamente anche il lavoro cardiaco e quindi questo è uno svantaggio anche in termini di efficienza cardiaca. Un altro aspetto è che un'elevata stimolazione adrenergica determina nel tempo una down regolazione dei recettori per cui il cuore diventa per certi aspetti dipendente dall'attività adrenergica e sempre più condizionato da questo.
Recettori: cuoreà beta 1 periferiaà alfa 1 per vasocostrizione e per determinati distretti beta 2 per vasodilatazione. A livello renale l'attività adrenergica è molto importante perché media uno dei meccanismi per il rilascio della renina, mediante stimolazione adrenergica mediata sia dai recettori beta2 soprattutto, sia recettori alfa1. Aumento dell'attività adrenergica (condizione che si verifica

nello scompenso cardiaco) questo contribuisce invariabilmente ad un maggiore rilascio di renina. Renina-Angiotensina- Aldosterone. Quindi aumento attività adrenergica implica aumento del lavoro cardiaco, per vasocostrizione e aumento dei parametri di attività miocardica, ed espansione di volume, indirettamente attraverso il rilascio di renina (esso accompagna le fasi più tardive di scompenso cardiaco).
3^ meccanismo: DILATAZIONE E IPERTROFIE MIOCARDICHE
E' il rimodellamento strutturale a carico del cuore: il processo di ipertrofia. I meccanismi che portano, nel tempo, ad unificare le strutture della parete cardiaca e anche la volumetria delle camere cardiache, prevede sostanzialmente una serie di segnali che sono legati a fattori meccanici, cioè aumento di volume e aumento di pressione (quello che abbiamo visto per la risposta parafisiologica della fasi iniziali di variazioni funzionali del cuore in caso di insufficienza) nel tempo sicuramente questi segnali, più una serie dI segnali che giungono da un differente pattern citochinico,da un differente ambiente in cui soprattutto angiotensina e catecolammine vengono continuamente stimolate; in questo ambiente di modifica della pressione e dei volumi di stimoli umorali, si determina un rimodellamento cardiaco , per certi aspetti anche questo finalizzato a migliorare la performance cardiaca . Anche in questo caso però, nel tempo determina uno dei meccanismi attraverso ai quali la funzionalità del cuore tende a decrescere e ridursi, questo avviene indipendentemente, in modo quasi a cascata rispetto alle condizioni iniziali, per cui progredisce verso lo scompenso più grave e la condizione d' insufficienza cardiaca.
Il rimodellamento cardiaco prevede alcune modifiche della struttura che sono abbastanza caratteristiche, la condizione di evoluzione della struttura cardiaca verso la condizione d'insufficienza può seguire sostanzialmente due vie:
• La prima è quella che porta al rimodellamento nell'ipertrofia di tipo COCENTRICO, nella quale i nuovi sarcomeri e la riorganizzazione della proliferazione cellulare avviene per apposizione parallela, per cui si affiancano l'una all'altra e questo determina una 'non variazione' dello spessore della parete, ma un aumento dei diametri delle camere cardiache; dall'altra una apposizione in parallelo, per cui aumenta lo spessore della parete senza che si modifichino i volumi delle camere cardiache . È l'ipertrofia così detta concentrica.
• Essenzialmente alla fine tutte le condizioni che portano ad un eccesso dei volume delle camere cardiache, determinano a lungo termine un incremento di diametri delle camere attraverso l'ipertrofia di tipo ECCENTRICO , cioè apposizioni in serie di nuove cellule, di nuovi sarcomeri. Mentre tutte le condizioni che determinano un primario incremento di pressione delle camere cardiache si accompagnano ad un ipertrofia di tipo concentrico. Mentre l'insufficienza contrattile o il sovraccarico di pressione si accompagnano ad un'ipertrofia di tipo eccentrico.
Il concetto di ipertrofia è per certi aspetti un concetto in sé patologico, perché questo tipo di rimodellamento non è solo un rimodellamento della struttura muscolare, ma è complessivo della struttura miocardica, per cui la componente muscolare tende a essere alla fine sempre meno rappresentata rispetto alle altre componenti, tessuto fibroso, fibroblasti e altre cellule; soprattutto perché perde di capacità per unità di volume di massa cardiaca l' efficienza è meno .
Un certo grado di ipertrofia fisiologico può accompagnare una maggiore attività fisica (es. uno sportivo). Quello che differenzia sostanzialmente il cuore ipertrofico nella condizione dello scompenso cardiaco rispetto alle condizioni di attività fisica, quindi dove avviene un certo grado di ispessimento delle pareti, un certo aumento di volume rispetto ad un soggetto non allenato, è che in quest'ultimo caso non c'è tutto quell'ambiente di stimolazione adrenergica, di angiotensina, di fattori proinfiammatori che sono presenti nell'insufficienza cardiaca.
Quindi quel grado di ipertrofia è rappresentato essenzialmente da un numero maggiore di cellule, da un numero maggiore di sarcomeri, da un maggiore numero di miofibrille e quindi una maggiore efficienza cardiaca. Questo distingue un certo grado di ipertrofia fisiologica da ipertrofia patologica che accompagna lo scompenso cardiaco.
Per un certo periodo si era distinto tra ipertrofia adattativa che poteva essere per certi aspetti parafisiologica, e ipertrofia mal adattativa che invece comporterebbe un danno; alla fine anche per

le maggiori conoscenze ottenute, grazie all'ecocardiografia e altre tecniche, si è permesso di conoscere nel processo di ipertrofia alcuni aspetti tipici, che rappresentano comunque uno svantaggio in termini funzionali, al di la del danno miocardico in sé che si ha nello sviluppo dell'ipertrofia stessa.
Dal punto di vista strettamente classificativo, basandosi su due parametri molto semplici come sono la massa miocardica e lo spessore relativo delle pareti :
- in termini di ipertrofia concentrica si distinguono un possibile (1) rimodellamento concentrico, per cui le camere cardiache tendono a ridursi e quindi lo spessore relativo della parete tende ad essere maggiore però senza aumento della massa, quindi è una fase iniziale; a questa segue il classico sviluppo (2) dell'ipertrofia concentrica che però in certe condizioni, come ad esempio in certe forme di cardiomiopatia congenita, procede di per sé fin dall'inizio in cui la massa cardiaca è aumentata, il peso del cuore aumenta, e aumenta lo spessore relativo della parete.
-Infine(3) l'ipertrofia eccentrica in cui aumenta la massa cardiaca, lo spessore della parete è relativamente stabile, ma è aumentata complessivamente la volumetria delle camere cardiache .
Cominciamo da quest'ultima condizione, quindi l'ipertrofia eccentrica che porta ad una dilatazione del cuore: la tipica condizione che determina la dilatazione del cuore è una condizione per la quale ci possa essere un eccesso di volume nelle camere cardiache. Come si determina? Ad esempio in un'insufficienza di una valvola, come la mitralica, dove nella fase di contrazione, parte del sangue che dovrebbe essere diretto verso il circolo sistemico torna all'atrio perché trova una minor resistenza al flusso: tanto maggiore è l'insufficienza tanto questa ri-direzione verso l'atrio sarà importante . Quindi avremmo che nella fase di riempimento diastolico si parte da dei volumi telesistolici più elevati, per cui volume telediastolico(che è quello che determina la frazione di eiezione) è molto aumentato. Sostanzialmente ho un cuore che lavora sempre in condizioni di alti volumi, questo da solo può rappresentare lo stimolo per una crescita della massa muscolare cardiaca, per un rimodellamento della struttura non solo massa muscolare ma anche rimodellamento in tutta la struttura, per cui accresce la parete però determinando un volume maggiore, la massa cardiaca è aumentata ma lo spessore della parete non è aumentato.
E' un po' quello che accade nello sviluppo dell'aorta, dove un aumento di pressioni e di volumi nell'aorta distale (l'aorta addominale) determina una spinta verso l'esterno poiché la parete non è adattabile perché non ha una struttura muscolare. Tipo di segnale completamente diverso per certi aspetti, ma rispetto ad una condizione di rapporto parete-volume normale qui ho una massa ventricolare che aumenta un volume ventricolare che aumenta di molto, e siccome non c'è un ispessimento della parete, anche senza avere una condizione più estrema di riduzione dello spessore della parete nelle forme più avanzate, ho comunque un aumento dello stress di parete. L'aumento dello stress di parete rende il processo di per sé irreversibile, perché per ogni "in più" di volume ho un "in più" di stress di parete, quindi lo stimolo per la crescita verso l'esterno dell'allargamento della camera cardiaca è già mantenuto. Questo è un po' quello che accade nell'aneurisma (?) il meccanismo per cui maggiore dilatazione vuol dire maggiore stress di parete, porta di per sé a un maggiore dilatazione ulteriore, quindi in un certo senso irreversibile anche in termini puramente fisici.
Una condizione di questo tipo esaspera, per certi aspetti, la condizione determinata dagli agenti di Frank Starling: un adattamento dilatativo è previsto e ottimale sempre per ottenere una maggiore sviluppo di forza, è quello che accompagna fin dall'inizio lo scompenso cardiaco, perché se ho un certo grado di ristagno al termine della sistole, per una frazione di eiezione che comincia a ridursi, i volumi sono necessariamente aumentati in diastole al di là di ogni altro parametro; se io ho una contrattilità un po' ridotta ho comunque un ristagno, quello che accade in un cuore che ha avuto un danno ischemico perché la contrattilità viene persa e quindi avrò una minore frazione di eiezione, poiché viene perso il denominatore, quindi aumenta il ristagno.
Quindi sia un aumento di volume sia una perdita di forza contrattile determinano tendenzialmente una dilatazione delle camere cardiache, con successiva ipertrofia eccentrica. Quindi se si superano i parametri o perché manca la forza contrattile di per sé, o perché supero i volumi l'efficienza nel

tempo decresce. In questo modo si va nel plateau di quella relazione pressione-volume determinato dalla legge di Frank Starling. Una dilatazione di questo tipo non determina vantaggi funzionali: tanto più è ampia tanto più il danno, in termini assoluti, è maggiore perché aumenta sempre più il ristagno telesistolicoà tanto più si riduce la forza contrattile per unità di superficie tanto più si riduce lo stress di parete, alla fine questa condizione definisce l'insufficienza cardiaca da disfunzione sistolica, condizione presente all'inizio che si determina sempre più al termine del processo.
Bisogna immaginare una dilatazione cardiaca, un' ipertrofia di tipo eccentrico che tende progressivamente a peggiorare. Non può restare di per sé in condizioni relativamente stabili, perché anche per applicazioni delle leggi puramente fisiche, questo determina di per sé una maggiore incapacità di adattamento funzionale.
Esempio: se voi avete un palloncino con una parete relativamente piccola e questo viene riempito di acqua, il palloncino si distende sempre più e alla fine scoppia. Se abbiamo una distensione sovra ottimale lo svuotamento sarà poco completo e poco efficiente. Il processo in evoluzione porta sempre più a dilatazione e nelle fasi finali il volume, cioè il raggio della camera su spessore di parete, diventa estremamente scorretto.
Queste sono le condizioni che trovate nei soggetti che sono candidati ai trapianti cardiaci, ci sono strutture miocardiche ampiamente dilatate che occupano un'estesa porzione del torace, occupando spazi che dovrebbero essere riservati ad altre strutture; in queste situazioni con un cuore così dilatato si è incapaci di spingere il sangue in modo adeguato. Quello che è tipicamente presente in queste condizioni è una progressiva riduzione della frazione di eiezione. Questa è calcolabile con una sonda e con un ecografo, con i quali si può misurare con grande facilità spessore della parete e volumi e calcolare sulla base di questo e sulle basi del ciclo cardiaco la frazione di eiezione. In questo specifico caso si andrà ad evidenziare una riduzione della frazione di eiezione, ovvero una disfunzione sistolica, che non ne è la causa bensì la conseguenza.
L'IPERTROFIA CARDIACA si determina essenzialmente quando c'è un'aumentata pressione all'interno delle camere cardiache. La più tipica ipertrofia è un ipertrofia concentrica, l'iperteso ha un cuore con ipertrofia concentrica. E' ipertrofia anche quella eccentrica perché se pesate un cuore di un cardiopatico in fase avanzata pesa di più di quello di un individuo normale.
L'ipertrofia concentrica è un adattamento funzionale, anche in questo caso dal punto di vista finalistico ho necessità di avere un lavoro cardiaco maggiore: lo stroke volume dev'essere mantenuto in presenza di elevati valori di postcarico, quindi elevate resistenze vascolari quindi è finalisticamente utile. Questo accade fisiologicamente in un soggetto allenato però qui c'è un incremento patologico, strutturalmente il miocardio è modificato e quello che si determina sostanzialmente sono due cose:
- inizialmente in una fase di rimodellamento senza ipertrofia c'è una ristrutturazione del miocardio, una struttura del ventricolo che tende ad avere un lume più piccolo e quindi un più favorevole rapporto spessore di parete/ diametro. Quindi uno stress di parete più basso.
– se lo stimolo permane, l'ipertrofia determina un aumento progressivo dello spessore della parete, la massa del tessuto miocardico aumenta e il lume tende progressivamente a ridursi.
Di conseguenza c'è un certo grado di vantaggio nel determinare, in presenza di alte pressioni, una parete più spessa, perché sicuramente la forza contrattile è maggiore. Tuttavia se la camera cardiaca si riduce avremo un minor riempimento in fase diastolica, e se la parete aumenta di spessore avremo anche una minor distensione in fase diastolica. Quindi fin dalle fasi iniziali in un processo di ipertrofia di tipo concentrico quello che si manifesta è un'alterazione di parametri funzionali cardiaci che riguardano più il precarico, quindi si sviluppano in conseguenza ad un alterato postcarico ma quello che si sviluppa e che determina è un alterato precaricoà alla fine anche questa condizione non determina un vantaggio di funzione nel lungo termine.
Quindi la condizione è di: alterato spessore della parete, riduzione della compliance , riduzione del volume delle camere cardiache, riduzione del precarico e alla fine in virtù delle condizioni iniziali, ovvero di alta pressione, il che significa aumento delle RPT, avrò anche una riduzione del battito cardiaco. Quello che si manifesta precocemente, presente in una fase molto iniziale anche del

rimodellamento concentrico è una condizione di disfunzione diastolica(viene alterata la capacità di riempimento) poi compare la disfunzione sistolica. Bisogna tenere presente che da una forma di ipertrofia concentrica si può passare nel tempo ad una forma di ipertrofia eccentrica dilatativa perché nel frattempo sono intercorse alterazioni strutturali del cuore. Tipicamente un soggetto con ipertensione arteriosa va incontro ad un ipertrofia concentrica apprezzabile molto precocemente, decenni prima che si manifestino i quadri di scompenso, dove sicuramente avrò una disfunzione diastolica e una riserva funzionale ridotta ,ma nel tempo un rimodellamento strutturale del miocardio, può portare ad una dilatazione delle camere cardiache, per cui si passa da un ipertrofia concentrica ad una eccentrica. Quindi i due modelli non sono separati, anche se da un ipertrofia eccentrica non si può passare ad una concentrica può avvenire nel tempo l'inverso, anzi è il destino di numerosi quadri; quindi compare una dilazione delle camere cardiache perché aumenta il volume telediastolico e telesistolico.
I fattori che concorrono a determinare condizioni di ipertrofia sono molti:
I due determinanti principali sono variazioni di pressione e di volume. Un eccesso di pressione e di volume sono due modelli d'innesco dell'ipertrofia. Una disfunzione valvolare comporta un aumentato volume sia in fase sistolica che diastolica delle camere cardiache, e questo comporta l'inizio della progressione dell'ipertrofia eccentrica. Un cronico aumento della pressione arteriosa è lo stimolo sufficiente per determinare un ipertrofia concentrica.
Altri fattori sono l'età avanzata, l'etnia (verso ipertrofia concentrica), fattori genetici che sono molto importanti, come alterazioni alla struttura citoscheletrica che determinano con più facilità un ipertrofia di tipo eccentrico, alterazioni di tipo genetico delle strutture contrattili e delle miofibrille(es. mutazioni alla miosina) che possono determinare minore forza contrattile per unità di massa che più facilmente si accompagnano ad un ipertrofia di tipo concentrico, altro fattore è l'attivazione dell'ambiente extracellulare come l'infiammazione (es. la flogosi cronica). Oppure alterazioni della nutrizione del tessuto, perché ho una malattia che coinvolge l'arteria coronaria su base arteriosclerotica oppure un diabete che coinvolge un rimodellamento vascolare anche del microcircolo che determina un'ipossigenazione, queste sono condizioni che favoriscono uno stato di ipossia tessutale, di un maggiore rimodellamento strutturale con perdita di massa muscolare e aumento del tessuto fibroso che determinano le condizioni che favoriscono la dilatazione cardiaca. Bisogna tenere presente che concorrono più fattori per determinare l'innesco e lo sviluppo dell'ipertrofia. Primo fra tutti il sovraccarico di pressione e di volume, però insieme a fattori genetici e a tutto quel contorno che hanno causato o che accompagnano la disfunzione miocardica.

Lezione di Patologia generale e fisiopatologia clinica (sem2) del 18/3/2013 (1)

Lezione di Patologia generale del 18/03/2013

Sbobinatore: Giulia Deguidi

Revisore: Francesca Nalin

(le slides non sono ancora state caricate)

-

CITOCHINE

Iniziamo a parlare di alcune citochine; noi tratteremo quelle che riguardano:

- Infiammazione
- immunità innata e specifica
- altri processi.

Nella prima slide vediamo un'immagine che illustra l'importanza di queste citochine, le quali fungono da messaggeri nelle varie cellule. Le citochine vengono prodotte dalle cellule in risposta a stimoli appropriati e ciascuna citochina innesca una serie di risposte in base alle diverse stimolazioni, orchestrando le risposte biologiche.

CITOCHINE PRO-INFIAMMATORIE

Sono tutte quelle citochine che vengono prodotte durante la risposta infiammatoria, e che quindi promuovono lo sviluppo dell'infiammazione.

Requisiti a cui devono rispondere tali molecole per essere classificate come mediatori infiammatori:

1. Sono assenti nello stato stazionario, ovvero normalmente sono assenti
2. Sono prodotte solo durante il processo infiammatorio (la loro produzione viene indotta)
3. Sono in grado di mimare fenomeni infiammatori se iniettate
4. La loro inibizione determina la scomparsa dei fenomeni infiammatori osservati

Diapositiva "La cascata delle citochine infiammatorie"

Definiamo le citochine primarie, ovvero TNF e IL-1. Esistono meccanismi di blocco per tamponare delle patologie infiammatorie croniche.

Sono definite "primarie" in quanto vengono prodotte probabilmente inizialmente dalle cellule e avviano la cascata, in quanto vanno a stimolare la produzione di mediatori secondari, come ad esempio le citochine (effetto sinergistico).

Tra i mediatori secondari ricordiamo:

- le chemochine, prodotte dalla cellule in particolar modo in risposta a TNF e IL1
- CSFs (fattori di crescita per le cellule): inducono il midollo a produrre le cellule di cui ha bisogno in quel determinato momento
- Mediatori lipidici
- IL-6 molto importante per l'infiammazione.

Le citochine dunque, direttamente o indirettamente tramite l'attivazione di mediatori secondari, determinano il reclutamento (e la sopravvivenza) dei leucociti durante le risposte di fase acuta o cronica. Questi leucociti vengono stimolati da altri agonisti o da stimoli dell'ambiente, producono mediatori ed altre molecole, e dopo molto tempo si può sviluppare l'immunità specifica.

Questo schema illustra anche alcuni dei mediatori e delle citochine che hanno effetti negativi, tra cui:

1. IL-10: citochina anti-infiammatoria per antonomasia
2. TNF beta: interviene in caso di infiammazione acuta o cronica, tumori, fase ripartiva
3. Glucocorticoidi: potentissimi anti-infiammatori che, tra le tante funzioni, inibiscono la produzione di TNF/IL-1, attraverso l'inibizione ad esempio di NF-Kbeta (fattore di trascrizione importante per TNF)

Diapositiva: "Citochine dell'immunità innata"

Elenco delle citochine che tratteremo:(legge pari pari la slide, ndr)

- TNF
- IL-1
- Chemochine
- IL-12: ponte tra immunità innata e specifica, fondamentale per la polarizzazione dei linfociti TH1
- IFN alfa/beta
- IL-10, IL-6, IL-15, IL-18

1. **I. SISTEMA DELL'IL-1**

Si tratta di un sistema rappresentato da una serie di interleuchine, assenti in condizioni omeostatiche, ovvero che non vengono prodotte in modo costitutivo ma solo in risposta a uno stimolo pro infiammatorio.

Caratteristiche:

1. Vengono prodotte in forma di procitochina pro-IL-1, poi processate a livello intracellulare dalla caspasi 1.

1. Esistono due agonisti, ovvero 2 citochine che agiscono sullo stesso complesso recettoriale, rappresentato dalla famiglia dei IL-1R/TLR:
   1. ***IL-1 alfa***: prodotta principalmente dalle cellule di origine epiteliale, solitamente si trova all'interno della cellula e non ha bisogno di essere rilasciata per esercitare la sua azione, in quanto ha attività biologia anche il suo precursore intracellulare

1. ***IL-1 beta***: prodotta da tante cellule e principalmente dai fagociti

1. Spesso agiscono in modo sinergico col TNF

1. La famiglia delle IL-1 (da IL-1F1 all'IL-1F11) comprende anche altri membri tra i quali è importante ricordare:

- **IL-1 Ra** (receptor antagonist), antagonista naturale per IL-1 alfa/beta

- **IL-18** di cui abbiamo parlato nelle lezioni precedenti riguardanti l'inflammosoma, precursore dell'IL-1beta e IL-18 (inizialmente IL-18 venne chiamato IGIF, ovvero una molecola prodotta in un supernatante, capace di indurre lFN gamma. Poi data la sua somiglianza con l'IL-1 è stata denominata IL-18). Agisce su un recettore relativamente specifico.

- **IL-38** l'ultimo clonato, che corrisponde all'IL-1 F10

- **IL-33** che condivide la catena accessoria col recettore dell'IL-1

- Altre IL elencate in tabella.

Due concetti interessanti su questi membri appartenenti alla stessa famiglia sono:

èQueste molecole possono condividere delle catene recettoriali e anche catene regolatorie.

èPur appartenendo alla stessa famiglia, alcune hanno attività anti-infiammatoria (come IL-37), altre invece pro-infiammatoria.

1. Esistono due fattori regolatori che conferiscono a questo sistema un alto livello di specificità e sofisticatezza.

Diapositiva: Vediamo un'altra tabella che riassume alcune delle funzioni biologiche delle citochine della famiglia di IL-1 *(non legge la tabella, ndr)*

Diapositiva: Nel primo articolo si parla della scoperta sorprendente di un membro della famiglia dell'IL-1 con azione anti-infiammatoria, negativa, ovvero IL-37. Nel secondo articolo si parla dell'ultimo membro clonato appartenente alla famiglia IL-1, ovvero IL-38.

Diapositiva: Questa diapositiva illustra una figura pubblicata nell'84, in cui già venivano sottolineate le azioni biologiche di questa molecole. Stimoli in grado di attivare i fagociti, quali ad esempio microrganismi, prodotti di origine microbica, antigeni AB, linfochine (si riferiscono alle citochine prodotte dai linfociti), danni di vario genere, sostanze adiuvanti, immunocomplessi,

tossine, processi infiammatori ecc… erano in grado di indurre l'attivazione dei fagociti mononucleati e quindi la produzionedell'IL-1. Tale molecola veniva chiamata in vari modi:

- Mediatore endogeno leucocitario

- Piogeno endogeno

- Fattore prodotto dalle APC in grado di attivare i linfociti T (l'importanza di questa funzione nel tempo è diminuita)

- Fattore delle cellule mononucleate

AZIONI BIOLOGICHE DI IL-1 *(in riferimento alla figura dell'84, ndr):*

1. Fattore in grado di indurre la febbre, agendo sull'ipotalamo (funzione mediata da PGE2, svolta anche da IL-6)
2. Fattore in grado di attivare direttamente i neutrofili
3. Fattore in grado di stimolare i fibroblasti per la produzione del collageno
4. Fattore in grado di agire sui muscoli, inducendo il rilascio di amminoacidi
5. Fattore in grado di agire sul fegato, inducendo la sintesi delle proteine della fase acuta
6. Fattore in grado di agire sui linfociti T, quindi mediarne l'attivazione e la produzione dell'IL-2 responsabile della loro proliferazione
7. Fattore in grado di agire sui linfociti B, quindi ne media l'attivazione e favorisce la sintesi di anticorpi

Già questo quadro sottolineava dunque l'importanza di questa molecola; ora sappiamo in modo più articolato quali sono le **funzioni di IL-1 beta** (sono le stesse funzione svolte da IL-1alfa qualora venga rilasciato):

1. Efficacia nel reclutamento dei neutrofili in situazione infiammatorie nei tessuti a livello locale: macrofagi o monociti vengono stimolati a produrre IL-1beta, il quale a sua volta agisce sulle cellule endoteliale o sui fibroblasti e ne induce la produzione di chemochine (come CXCL8 e CXCL1) o IL-6, in grado di reclutare i neutrofili
2. Sono in grado di influenzare la trasmigrazione dei leucociti in quanto vanno ad esempio ad indurre l'espressione delle selettine da parte delle cellule endoteliali, o ad indurre la trascrizione di alcuni geni delle integrine che possono favorire l'adesione ferma o il rotolamento.
3. Possono agire a livello del gene termoregolatore andando ad indurre la trascrizione di PGE2, responsabile della febbre. Proprio per questo era stato denominato "pirogeno endogeno". Altre citochine tuttavia possono indurre la febbre con lo stesso meccanismo, come ad esempio IFN-alfa, IL-6
4. Capacità di stimolare la produzione di piastrine
5. Capacità di agire sulle cellule endoteliali
6. Capacità di indurre, tramite IL-6, la produzione delle proteine della fase acuta

<u>Diapositiva:</u> riassume tutti gli effetti osservabili in vitro e in vivo nell'<u>animale</u> di IL-alfa/beta:

- **<u>Effetti metabolici</u>**: influenza la concentrazione di metaboliti e mediatori che partecipano alla risposta infiammatoria (vedi diapositiva)

- **<u>Effetti fisiologici</u>** implicati nell'omeostasi e anche nelle patologie: ad esempio provoca febbre, calo dell'appetito, escrezione di sodio, stato di shock, aumenta la produzione di PAF

- **<u>Effetti infiammatori</u>**: aumenta la produzione di COX2 (ciclo ossigenasi2 è un enzima che viene indotta durante una risposta infiammatoria e induce la produzione dei metaboliti dell'acido arachidonico), NO (insieme al TNF promuove la sintesi dell'acido sintasi), PLA2 fosfolipasi2, PAI-1 plasminogeno, ICAM-1, VEGF, IL-1, IL-1 Ra, IL-37,TNF, chemochine

- **<u>Effetti ematologici</u>** (vd. Diapo)

- **<u>Effetti immunologici</u>** (vd. Diapo)

<u>Diapositiva:</u> la tabella elenca le risposte <u>umane</u> all'iniezione intravenosa di IL-1 alfa/beta , quali ad esempio: febbre, mialgie, affaticamento generale, mal di testa, nause, neutrofilia, trombocitosi…

(legge pari pari la slide, ndr)

<u>Diapositiva:</u> questa tabella elenca le risposte discusse nelle figure precedenti, che possono essere indotte sia in maniera additiva sia in maniera sinergistica dal TNF, ovvero:

® **reazione di fase acuta**: aumento della febbre, aumento del sonno, diminuzione dell'appetito, neutrofilia, shock;

® **effetti a livello delle cellule endoteliali**: aumento dell'adesione leucocitaria (che ne facilita la trasmigrazione), aumento della sintesi di PGI, aumento dell'attività dei coaugulanti;

® **effetti a livello dei fibroblasti**: aumento della proliferazione e sintesi del collagene, attivazione della cascata dell'acido arachidonico per la sintesi di PGE;

® **Stimolazione dei leucotiti** a produrre altre citochine, come ad esempio la produzione per via autocrina di IL-1 o TNF.

Recentemente è stata scoperta un’ulteriore attività biologica di IL-1: essa è coinvolta nella maturazione dei linfociti T naive a linfociti TH17, in risposta a determinati antigeni provenienti da funghi o batteri extracellulari. I TLR sono implicati nel riconoscimento dei PAMP di questi agenti patogeni (riconosciuti da Dectin-1), poi l’APC di una cellula dendritica presenta questi antigeni ai linfociti T naive, i quali sono in grado di stimolare la cellula dendritica a produrre delle citochine che in concerto dettano la maturazione a linfociti TH17. In questa tappa maturativa sono coinvolte IL-1 e IL-6 in modo particolare, poi in un secondo momento interviene anche IL-23 per stabilizzare i cloni TH17. Al contrario IL-12 o IFN gamma inibiscono la maturazione dei TH17.

Una via di segnale utilizzata da questo complesso recettoriale, attiva il complesso NF-KBb e induce così l’espressione di una serie di mediatori proinfiammatori. La via di trasduzione passa per Myd88, quindi è un signalling molto simile a quello dei TLR che legano Myd88, perché il recettore di IL-1 presenta nella porzione intracitoplasmatica il dominio TIR.

Esistono vari TLR che presentano il dominio TIR ed inoltre esistono catene recettoriali del sistema di IL-1, quali ad esempio i recettori di IL-33 o IL-18, che legano tale dominio. Questo dimostra l’importanza di tale dominio TIR.

REGOLAZIONE DEL SISTEMA IL-1

Esistono due meccanismi di regolazione di IL-1 alfa/beta a livello del recettore, molto sofisticati:

1. **Un meccanismo è operato da IL-1 Ra, inibitore solubile naturale** = vera e propria citochina inibitoria endogena che si lega al recettore di IL-1, inibendo il legame dell’agonista al suo recettore e non attivando il signalling.

Caratteristiche:

- è prodotto dalle stesse cellule che producono IL-1, quali monociti, macrofagi, neutrofili attivati, epatociti, fibroblasti, e dagli stessi stimoli (ad esempio è indotto dall’LPS) MA IN TEMPI RITARDATI rispetto alla produzione di IL-1, per dar tempo alla cascata infiammatoria di realizzarsi e per bloccare poi con un meccanismo a feedback negativo gli effetti di IL-1. *(vd grafico, ndr)*

- impedisce il legame dell’agonista al proprio recettore ma, anche nel caso in cui l’agonista si legasse, blocca il recettore impedendo il signalling, senza indurre una risposta da parte delle cellule (per questo è un antagonista recettoriale e non cellulare). Come avviene?

IL-1 si lega al recettore, il quale recluta una catena accessoria a formare un complesso recettoriale in grado di mandare il segnale intracellulare attivando la cascata che porta alla produzione di mediatori proinfiammatori.

Se al contrario si lega IL-1 Ra al recettore, impedisce il reclutamento della catena accessoria, quindi non formandosi il complesso, inibisce l'attività biologica di IL-1.

Diapositiva che illustra una serie di modelli ed esperimenti sull'IL-1 Ra:

- modelli locali di infiammazione
- modelli neoplastici
- difetti di risposta dell'ospite
- modelli infiammazione polmonare acuta/cronica

(il prof. si limita a leggere i titoli degli esperimenti, ndr)

Diapositiva: Articolo del New England del 4 Giugno 2009, in cui si parla di alcune malattie genetiche in giovane età (le immagini sono tutte di neonati, ndr) correlate alla deficiente produzione di IL-1Ra. Si tratta di infiammazioni acute sterili (ovvero non dovute a infezioni), molto gravi a livello di ossa, pelle, cartilagini, vari organi altamente invalidanti. Tali pazienti sono curati somministrando IL-1Ra ricombinante.

1. **Un altro meccanismo è operata dai "falsi recettori" (decoy receptor) sulla membrana o solubili** (entrambi sequestrano): si tratta di recettori **IL-1 R tipo II** in grado di legarsi a IL-1 in forma sulla membrana, ma non funzionano perché non hanno il dominio intracitoplasmatico TIR oppure se sono in forma solubile possono essere rilasciati e neutralizzano IL-1 a livello extracellulare. Quindi i decoy receptor non possono mandare il segnale anche se reclutano la catena accessoria.

E' molto importante ricordare che IL-1Ra ha un'affinità molto bassa per IL-1, perciò per legarsi ad esso ed impedire il legame dell'agonista al recettore dev'essere prodotto in concentrazioni anche 1000-10000 volte superiori rispetto a IL-1, il quale invece funziona a concentrazioni molto basse dell'ordine dei nanogrammi /picogrammi.

CIRCUITI DI REGOLAZIONE NEGATIVA DELLE CITOCHINE PROINFIAMMATORIE

Questi sistemi di controllo possono essere amplificati, regolati, stimolati. Stimoli con azione notoriamente antiinfiammatoria come IL-10, TGF beta, glucocorticoidi utilizzano vari meccanismi per promuovere la loro azione, ovvero:

1. Possono inibire direttamente la trascrizione e la sintesi di IL-1

2. Possono inibire <u>indirettamente</u> IL-1, inducendo la produzione di IL-1Ra o aumentando l'espressione dei decoy receptor.

Perciò esistono in natura azioni biologiche che tramite tali mediatori antinfiammatori vanno ad influenzare i diversi livelli di regolazione del sistema di IL-1. Si tratta dunque di circuiti di <u>regolazione negativa</u> delle citochine primarie dell'infiammazione.

ATTIVAZIONE DI IL-1 alfa/beta

- Nel caso di <u>IL-1beta</u> è importante il ruolo dell'inflammosoma, complesso intracellulare multi proteico che serve per attivare il precursore della caspasi 1, che una volta attivato va a degradare pro-IL-18 e pro-IL-1beta in modo da ottenere il frammento solubile biologicamente attivo che poi verrà rilasciato.

- Al contrario <u>IL-1alfa</u> agisce sullo stesso recettore di IL-1beta ma normalmente non viene secreta, è sintetizzata e tenuta a livello intracellulare soprattutto nelle cellule epiteliali e nei fibroblasti. Quindi sia il precursore sia la forma attiva (anch'essa viene degradata dall'inflammosoma) hanno entrambe attività biologica, perciò può essere rilasciata in caso di danno cellulare o necrosi e scatenare così una risposta infiammatoria. Viene infatti classificata nella famiglia delle ALARMINE, molecole intracellulari che agiscono sui TLR in risposta a necrosi o danno cellulare, scatenano risposte infiammatorie.

Le infiammazioni sterili, causate anche dall'IL-1alfa, sono alla base di una serie di patologie come la malattia di Alzheimer, sclerosi laterale neutrofica, infarto miocardico, patologie autoimmuni, diabete tipo II, obesità, gotta, aterosclerosi, alcune artriti, che hanno una componente infiammatoria notevole. Tali patologie vengono dunque trattate con l'inibitore dell'IL-1, come ad esempio IL-1Ra (il farmaco commerciale si chiama "Anakin". *Non sono certa del nome, ndr*), o anticorpi con singole somministrazioni che possono durare per mesi.

<u>EFFETTI BIOLOGICI DI IL-18</u>

Questa citochina ha varie cellule bersaglio:

- Stimola le cellule dell'immunità innata come le NK
- Stimola l'espressione di Fas-ligando su cellule T e Nk
- Stimola l'attività citotossica di CD8+ effector Tcell
- Sostiene la maturazione e l'attività dei TH1, con varie tappe a cascata che possono essere regolate negativamente o positivamente da altre citochine come IL-12.

<u>EFFETTI BIOLOGICI DI IL-33</u>

Questa citochina, clonata recentemente, è nuova nel mondo dei TH2 ed è in grado di:

- Attivare le risposte dei linfociti TH2

- Promuove la polarizzazione dei linfociti TH2

- Attivare le cellule effettrici contro ad esempio macroparassiti

N.B. Nelle patologie infiammatorie croniche, è molto difficile misurare nel sangue dei pazienti i livelli di IL-1beta e TNF, ma si somministrano comunque farmaci molto efficaci contro tali citochine.

1. **II. SISTEMA DEL TNF**

Caratteristiche:

1. Assente in condizioni di omeostasi

1. La sua produzione è indotta da stimoli infiammatori

1. Viene prodotto principalmente dai fagociti

1. Viene prodotto come omotrimero di membrana, poi viene processato a livello extracellulare e infine viene rilasciato in forma solubile da un enzima specializzato detto TACE (può essere un bersaglio in terapia per bloccare il TNF), pur essendo attivo anche in forma di membrana.

1. Molto spesso agisce in modo sinergico con IL-1

1. Viene prodotto da diversi tipi cellulari come:

- Nel sistema immune: monociti/macrofagi, linfociti B e T, cellule NK, microglia, mastociti, granulociti
- In altri organi: cellule di Kuppfler, cellule epiteliali retiniche, fibroblasti, cellule muscolari lisce, astrociti, osteoblasti, cheratinociti, cellule spermatogeniche
- cellule tumorali di vario genere.

1. Le molecole che inducono la trascrizione del TNF sono: TRL2, NOD, recettori di cellule B e T, antigen receptor ligands,IFNgamma, altre citochine, superantigeni, vari recettori, altri stimoli come batteri, virus, protozoi

AZIONI DEL TNF

1. Induce la produzione e il rilascio di altre citochine infiammatorie (IL-1, IL-6, IL-23, GM-CSF)
2. Induce la produzione di chemochine
3. Induce la produzione di proteine della fase acuta
4. Induce l'attivazione della cascata dell'acido arachidonico per la sintesi di PGE2
5. Induce l'attivazione di osteoclasti, stimolando il riassorbimento osseo
6. Induce l'attivazione di condrociti con rilascio di enzimi come la metalloproteasi che possono promuovere la distruzione della cartilagine
7. Favorisce l'induzione e il mantenimento dell'espressione delle molecole HLA II (direttamente e in modo sinergico con IL-1), favorendo l'accumulo di leucociti
8. Promuove l'angiogenesi
9. Induce l'attivazione di cellule endoteliali

Le attività biologiche di IL-1 e TNF dipendono strettamente dalla loro <u>*concentrazione:*</u>

- si hanno <u>effetti biologici locali</u> se ci sono ***basse concentrazioni di TNF***: tipica azione pro infiammatoria. Agisce su:

1. FAGOCITI: provoca un aumento delle capacità adesive, dell'attività fagocitica, delle capacità citotossiche.
2. ENDOTELIO VASCOLARE: induzione di attività pro-coagulante, induzione di chemochine e molecole di adesione.
3. TESSUTI MESENCHIMALI: induzione di metalloproteasi.

- si hanno <u>effetti sistemici</u> a ***moderate concentrazioni*** perché TNF entra in circolo, normalmente in concomitanza di elevate concentrazioni di IL-1 e IL-6: il TNF partecipa agli effetti sistemici della fase acuta. Agisce a livello di:

1. ipotalamo con la comparsa della febbre
2. fegato con induzione di iposideremia, proteine di fase acuta e diminuzione della sintesi di albumina
3. progenitori ematopoietici nel midollo osseo con aumento selettivo della produzione di alcuni leucociti.

- si ha shock settico ad ***elevate concentrazioni***: LPS infatti induce la produzione di elevate concentrazioni di TNF (e altri mediatori) da parte delle cellule responsive, il quale a sua volta innesca la produzione a cascata di citochine infiammatorie come IL-6 e IL-8, determinando un'infiammazione acuta sistemica e una gravissima ipotensione = shock.

Ci sono esempi di geni chiave che sono indotti direttamente dal TNF:

- iNOS: enzima che produce l'ossido nitrico che ha una potente azione vasodilatatoria, favorisce la formazione dell'edema e contribuisce al rilascio di mediatori tossici contro patogeni intracellulari (enzima chiave nella flogosi cronica grazie all'attivazione dei macrofagi che rilasciano iNOS)
- VCAM1 ligando delle integrine espresso dalle cellule endoteliali, che favorisce l'adesione dei leucociti
- IL-8 il quale richiama i leucociti, soprattutto i neutrofili
- Attiva l'apoptosi grazie all'attivazione della cascata di trasduzione che porta all'attivazione della caspasi 8
- Attiva l'enzima LPL(lipoprotein lipasi), quindi è una citochina chiave della sindrome della cachessia, infatti veniva chiamata "cachettina": sindrome che indica uno stato di forte debilitazione (astenia, perdita dell'appetito, dimagrimento, perdita della massa muscolare) dovuta ad alterazioni metaboliche nei pazienti terminali portatori di tumore o con malattie infiammatorie croniche come TBC, artrite reumatoide.

Altre azioni del TNF:

a) Può determinare necrosi emorragica nel caso di tumori

b) Può essere citotossico verso alcune cellule tumorali in vitro

c) Può potenziare gli effetti di IFN gamma (sinergismo o addizione)

Se in un modello animale somministriamo il TNF in compresenza di un anticorpo anti- TNF, la loro sopravvivenza aumenta moltissimo rispetto ai topi a cui non è stato sommi strato l'anticorpo; ciò dimostra che la mortalità da shock indotto dal LPS è in gran parte mediato dall'azione del TNF.

d) Il TNF è implicato anche in azioni IMMUNOSOPPRESSIVE, è dunque importante per spegnere la risposta immunitaria specifica: uccide i linfociti T attivati dopo che questi hanno terminato il loro lavoro, altrimenti (se rimanessero attivi) potrebbero causare patologie linfoproliferative oppure induce l'apoptosi di alcune cellule bersaglio.

RECETTORI DEL TNF

Agisce legando due recettori:

1. TNF-R tipo I (p55)
2. TNF-R tipo II (p75)

Questi due recettori possono anche essere rilasciati in forma solubile e sono così in grado di legare il TNF all’esterno della cellula impedendone il legame con il recettore presente sulle cellule bersaglio, quindi hanno azione neutralizzante (meccanismo usato anche da molti farmaci). Oggi la terapia anti-TNF si avvale di molecole ricombinanti che mimano il recettore solubile o anche su anticorpi anti-TNF.

Possono essere espressi dalla stessa cellula o differenzialmente in diversi tipi cellulari.

Il TNF-R tipo I è in grado di legare TNF solubile e attivare due tipi di segnale:

1. Un segnale porta all’attivazione di NF-Kb, di alcune componenti delle MAPk e porta alla trascrizione di geni con azione proinfiammatoria e che favoriscono la sopravvivenza attraverso NF-kb. Questa via è controllata da chinasi e proteine adattatrici relativamente specifiche per questo recettore.

1. Un’altra caratteristica di questo recettore è di avere a livello della membrana un dominio intracellulare detto DEATH DOMAIN (dominio della morte) che si attiva, lega un complesso proteico detto APOPTOSOMA e può attivare la caspasi 8 che può mediare l’apoptosi delle cellule bersaglio.

Lezione di Patologia generale e fisiopatologia clinica (sem2) del 19/3/2013 (1)

Prof.: Marco Antonio Cassatella 19/03/2013

Sbobinatore: Alessio Mantovani

Revisore: Elena Paiola

TNF, IL-6 e FATTORI DI CRESCITA

TNF

[*La lezione era già iniziata NdR*]… p55 (la cui struttura è abbastanza complicata), poi tutti i recettori che funzionano reclutando dei complessi proteici che contengono proteine adattatrici, proteine regolatorie (in genere chinasi) che si assemblano portando all'attivazione di varie componenti e poi alla fine la cascata di attivazione di queste componenti porta all'attivazione di varie cascate di trasduzione che nelle fasi finali portano all'attivazione di chinasi o tirosin-chinasi o serin-treonin-chinasi, le quali fosforilano i fattori di trascrizione, facendoli attivare.

RECETTORI DEL TNF

- *TNF-R1:* Nel caso del segnale dal TNF-R1 arriviamo alle classiche chinasi, che sono quelle che appartengono alle MAP chinasi, ERK, P38, JNK, che poi vanno a elementi specifici e le chinasi fosforilano anche altri fattori di trascrizione bersaglio come NF-kB, AP1 e CREB. Poi i complessi di trascrizione che si attivano a cascata vanno ad attivare i geni bersaglio [*viene mostrata la tabella con l'elenco dei geni di nostro interesse NdR*). Vi sono geni che sono implicati nel reclutamento leucocitario, nell'attivazione dei leucociti, nell'espressione dei recettori di superficie, che codificano per citochine infiammatorie come IFN-β, IL-6, PIF, TNF stesso, proteine che regolano il segnale di trasduzione (qui abbiamo un recettore negativo, che quindi spegne lo stimolo del segnale), fattori di trascrizione

(trascritti ex novo) per il modellamento della matrice, effetti vascolari, molecole di adesione, tutto indicato [*non si capisce NdR*] nella cascata dell'acido arachidonico.

Questo recettore, TNF-R1, ha una regolazione molto precisa: oltre a NF-κB, infatti, è in grado di attivare la cascata di trasduzione legata alla presenza di Death domain (TRADD), che induce l'apoptosi: infatti TNF è uno di quelle molecole che induce l'apoptosi nelle cellule provviste dell'appropriato recettore. Può quindi modulare da una parte la sopravvivenza, dall'altra l'apoptosi.

Nell'immagine si osserva la cascata: c'è il TNF-R1 che grazie al suo dominio intracitoplasmatico TRADD (death domain) è in grado di reclutare diverse proteine adattatrici a formare il famoso apoptosoma che attiva la via estrinseca dell'apoptosi attraverso le caspasi. Nella legenda dell'immagine si può vedere una serie di fattori che possono controllare negativamente l'attivazione di questa via, come per es. DR2 [*non sono sicuro NdR*] che è una proteina virale e poi tutta una serie di controllori che possono inibire o spegnere questa via, o controllarla negativamente.

La capacità del TNF-R1 di regolare l'apoptosoma è condivisa da altri recettori che appartengono alla superfamiglia del TNF, che legano cioè componenti di questa famiglia. Uno di questi è il FAS-receptor che lega il FAS-ligando, APO1, che attiva grazie al TRADD domain intracellulare la cascata di trasduzione che porta all'apoptosi. Tra poco vedremo dei membri della famiglia del TNF che legano dei recettori che grazie ai TRADD domain attivano l'apoptosi. Quindi TNF-R1 lega NF-κB, le MAP-chinasi e induce l'apoptosi.

-

- *TNF-R2:* non avendo intracellularmente il death domain attiva solo la cascata delle MAP chinasi e di NF-κB, quindi non è in grado di attivare l'apoptosi delle cellule.

Da qui risulta chiaro che la risposta al TNF dipende dal tipo di recettore che una cellula esprime: alcune infatti esprimono CD2, altre esprimono TNF-R1, altre TNF-R2, quindi le risposte dipendono dall'espressione dei recettori (che, come vedremo, possono anche essere rilasciati) e possono anche essere modulati dal punto di vista dell'espressione (aumentare o diminuire).

MECCANISMI DI REGOLAZIONE DELLA SINTESI DI TNF

Così come visto nella lezione precedente a proposito dell'IL-1, anche la sintesi del TNF è sottoposta a meccanismi di regolazione che avvengono a tutti i livelli dell'espressione genica:

- **Trascrizione**:TNF non è normalmente trascritto nella cellula, serve infatti uno stimolo che attiva AP1, NF-kB, NFAT che vanno poi a indurne la sintesi.
- **Posttrascrizionale:** Poi viene trascritto l'mRNA che passa nel nucleo e a livello del messaggero di TNF ci sono dei meccanismi di controllo precisi di cui si conosce tantissimo, tanto che sono l'esempio di meccanismi di regolazione dell'mRNA (studiati da un certo Boyler sui topi).
- Il messaggero può essere innanzitutto controllato a livello di stabilità, cioè può essere modulata l'*emivita.* A riguardo non sono ben conosciute le differenze nella sequenza dell'mRNA a livello delle quali intervengono i fattori che possono modulare la degradazione o l'utilizzazione.

- **Traduzione**: molto interessante è il meccanismo di controllo a livello della traducibilità. Ci sono dei segnali che amplificano la traducibilità del messaggero e aumentano la capacità di sintetizzare la molecola, soprattutto nei macrofagi: sono quindi segnali che, a parità di messaggero, fanno tradurre 1000 volte più efficientemente. Lo stesso Boyler di prima ha scoperto (oltre a TLR4 e TNF) che nei macrofagi c'è un controllo per cui essi producono quantità elevatissime di TNF, specialmente se c'è uno stimolo adatto. Come vengono controllati questi geni proinfiammatori si vede anche negli oncogeni, perché gli mRNA prodotti da essi sono sottoposti allo stesso tipo di controllo (soprattutto nel senso di degradazione della molecola): hanno la stessa sequenza del TNF a cui si legano ribonucleasi inducibili.

- **Posttraduzionali**: la proteina tradotta può restare nella membrana oppure essere secreta dopo processi di liberazione grazie a enzimi detti TACE (processo chiamato SHELDING o LIBERAZIONE IN FORMA SOLUBILE).Sulla membrana TNF funziona in forma trimerica e questo vale anche per molti degli altri membri della famiglia del TNF.
- **Controllo dell'azione del TNF**: Un altro meccanismo di controllo che è quello operato dai recettori rilasciati in forma solubile, i quali vanno poi a legarsi alla proteina solubile, inibendola.

Il TNF di membrana può quindi essere rilasciato in forma solubile e da lì agire attraverso i recettori della cellula, come TNF-R1 e 2 (i quali a loro volta possono veicolare le risposte di cui abbiamo parlato), ma vi sono meccanismi di controllo quali la secrezione dei due recettori (sTNF-R1 e sTNF-R2), che bloccano l'azione del TNF extracellulare.

REVERSE SIGNALING

C'è un'altra importante funzione biologica dei TNF di membrana: non solo stimolano il recettore, ad esempio TNF-R2, della cellula vicina, ma possono dare il *reverse signaling*, cioè il TNF cellulare può attivare un segnale nella stessa cellula che lo esprime e indurre delle risposte. Il meccanismo non è chiaro, si pensa che sia in grado di legare un recettore vicino. Ricordiamo che ciò è valido anche per gli altri membri, quindi TNFC30-ligando, FAS, ecc. Nell'immagine si vedono degli anticorpi, legati ai recettori TNF di membrana, che stimolano i segnali dentro la cellula.

ALTRI FATTORI CHE INTERVENGONO NEL CONTROLLO

Poi ci sono altri fattori che intervengono, ad esempio stimoli che favoriscono il rilascio dei recettori per il TNF, come i glucocorticoidi, proteine regolatrici, IL-13; oppure il TNF è in grado di stimolare la produzione di eicosanoidi, prostaglandine quindi possono avere un'azione negativa per quanto riguarda la produzione di TNF. Esso in certe cellule promuove la sintesi di IL-10 la quale ha un'azione negativa su TNF a livello trascrizionale. Inoltre ci sono i corticosteroidi che rappresentano una classe di farmaci e ormoni che producono TNF attraverso vari fattori come NF-κB.

INIBIZIONE DEL TNF

TNF è una citochina implicata in una serie di risposte protettive, ma quando la produzione non è controllata è chiaro che può portate alla patogenesi di una serie di malattie, come morbo di Crohn, Alzheimer, AIDS … che sono malattie infiammatorie, per questo già alcuni anni fa si è cercato di bloccare l'azione biologica o la sintesi di TNF.

Essa è coinvolta nella patogenesi dell'artrite reumatoide (malattia infiammatoria cronica delle articolazioni), molto invalidante: nella figura sono anche indicate alcune delle stazioni biologiche che sono importanti nella progressione della malattia, come l'aumento degli MHC II, l'attivazione dei linfociti e aumento delle molecole di adesione che favoriscono il reclutamento, la stimolazione del rilascio di varie citochine che fanno arrivare i leucociti all'interno dell'articolazione, liberazione di citochine, angiogenesi …, ecc. Si è quindi cercato di inibire la funzione di questa molecola (poi a partire dall'inibizione del TNF sono stati generati inibitori anche di altre citochine).

In particolare, gli inibitori comprendono:

- ANTICORPI MONOCLONALI che vanno a legare la citochina prima che si sia legata al recettore in modo da impedire il legame stesso: si parla in questo caso di neutralizzazione (grazie agli Ab che riconoscono la citochina come antigene).
- USO DI RECETTORI SOLUBILI RICOMBINANTI In grado di legare TNF prima che leghi il recettore localizzato sulla cellula.
- In sintesi, o blocchiamo la molecola, o blocchiamo il recettore: a riguardo, infatti, si possono usare ANTICORPI, ALTRI ANTAGONISTI RECETTORIALI e si può bloccare il recettore (senza stimolarlo ovviamente: no segnale).

Sono stati quindi sviluppati anticorpi neutralizzanti capaci di legare il TNF solubile e impedire il legame col recettore (umanizzati in modo che non diano reazioni avverse), oppure recettori solubili che legano le porzioni dei recettori solubili del TNF [*avrebbe senso "che legano il TNF" NdR*], come p55.

Al giorno d'oggi, insomma, esistono questi farmaci, prevalentemente anticorpi umanizzati, che sono molto specifici verso il TNF (es. influximab), oppure farmaci che mimano i recettori solubili che possono legare il TNF oppure altri membri della famiglia, ad esempio la linfotossina α (che è in grado di legare diversi recettori tra cui anche TNF-R1). Quindi questi farmaci sono molto efficaci nel trattare e diminuire la sintomatologia di questi pazienti; non li curano purtroppo, ma sono in grado di <u>bloccare i sintomi e l'infiammazione</u> e sono molto usati nell'artrite reumatoide (per i quali sono molto efficaci), nella malattia di Crohn (infiammazione cronica dell'intestino), nella psoriasi (e in particolare per le artriti psoriasiche).

L'utilizzo di questi farmaci ha un grande sviluppo, com'era successo per gli inibitori di IL1. L'uso di questi inibitori del TNF, quindi di farmaci in grado di colpire il bersaglio preciso responsabile di questi fenomeni è stato un grande avanzamento, che ha poi dato inizio alla possibilità di usare altri farmaci come citochine per la cura.

Attualmente i risultati non sono stati del tutto soddisfacenti perché nel caso dell'anti-TNF, innanzitutto, non tutti i pazienti rispondono a questa terapia: a seconda delle casistiche il 20-30% non risponde, quindi si è arrivati a pensare che l'artrite reumatoide sia in realtà una somma di diverse patologie che non conosciamo bene; in secondo luogo vi possono essere degli effetti collaterali anche pesanti: ad esempio effetti dell'anti-TNF sono le complicazioni infettive, nel senso che TNF è una citochina fondamentale per debellare le infezioni da patogeni intracellulari, come la

tubercolosi (un'infiammazione cronica che dà il granuloma tubercolare) dove il TNF è prodotto in particolare dai macrofagi per eliminare il *Mycobacterium*. Quindi una delle possibili complicazioni nel soggetto è un indebolimento delle difese locali che lo rende più suscettibile a malattie infiammatorie.

Non esistono solo inibitori, ma anche altri farmaci che inibiscono a vari livelli l'espressione di questa citochina, come i glucocorticoidi (che inibiscono a livello trascrizionale bloccando NF-κB), inibitori della P38, ma in definitiva gli anticorpi.

-

ALTRI MEMBRI DELLA FAMIGLIA DEL TNF

Nella slide vediamo da una parte le citochine membri della famiglia del TNF (come TNF-α, BAFF, APRIL TRIF), dall'altra i recettori che –come si vede dalle frecce- sono in buona parte condivisi dai vari membri: per esempio interessanti sono alcuni membri, come TNF-α, APO3L,APO2L/TRAIL, che sono citochine che legano dei recettori caratterizzati dalla presenza del TRADD domain [*come FAS, DR4, DR5, TNF-R1 e DR3 NdR*], per cui sono in grado di attivare la via estrinseca dell'apoptosi grazie al reclutamento dell'apoptosoma.

Alcuni dei suddetti ligandi sono molto importanti perché partecipano all'omeostasi della risposta immunitaria specifica agendo sui linfociti, altri come nel caso di TRAIL e degli altri 2 recettori DR4 e DR5 sono importanti nelle risposte antitumorali, perché il TRAIL grazie a questo meccanismo uccide le cellule tumorali che esprimono i recettori DR4 e DR5.

DECOY RECEPTOR:

Quindi ricordiamo che sono importanti perché mediano il segnale di trasduzione grazie al legame col recettore, ma queste stesse citochine possono anche legare dei recettori che non segnalano, che quindi funzionano come *decoy receptors*: in particolare se sono localizzati nella membrana non trasducono il segnale, se sono rilasciati in forma solubile impediscono alla citochina di legarsi al recettore di membrana.

-

MEMBRI:

- **TRAIL** lega 5 diversi recettori, ma solo DR4 e DR5 sono i recettori che attivano l'apoptosi, questi sono espressi solo dalle cellule tumorali, mentre quelle normali non li esprimono: TRAIL risulta essere davvero importante poiché è in grado di uccidere selettivamente le cellule tumorali. Poi questi recettori sono regolabili, inducibili, ecc.
- **LINFOTOSSINE** (α, β e miste con subunità di una e dell'altra): possono, legando TNF-R1 o TNF-R2, attivare certe risposte simili al TNF. Ma, soprattutto, le linfotossine sono importanti per l'organogenesi del sistema linfatico per la formazione dei linfonodi, le organizzazioni linfoidi secondarie e terziarie assieme alle citochine costitutive.

- Anche **IL-1a,** che è una delle ultime citochine scoperte di questa famiglia, è implicata nell'infiammazione in patologie quali l'artrite reumatoide e il morbo di Crohn.
- **RANKL** è un'altra molecola importante nell'immunologia delle ossa, nello sviluppo e nel rimodellamento, che lega un recettore specifico che si chiama RANK; poi vi è un altro recettore *decoy* detto osteoprotegerina (sigla OPG) che è solubile, può essere rilasciato, può legare RANKL ed è il recettore che impedisce l'attivazione dell'osteoclastogenesi e quindi la distruzione delle ossa (usato in terapia).
- Poi vi sono 2 citochine importantissime per l'omeostasi dei linfociti B: **BAFF e APRIL** promuovono la maturazione, la sopravvivenza, la produzione di anticorpi e sono infatti implicate nella patogenesi di malattie governate dall'alterazione della funzione dei linfociti B.
- **NGF** (neural growth factor, scoperta dalla Montalcini), fattore importante per la sopravvivenza dei neuroni, che lega recettori particolari e attiva vie di trasduzione diverse da quelle delle altre proteine.

PATOLOGIE ASSOCIATE

Queste citochine sono implicate nella patogenesi di tutta una serie di malattie: l'uveite, l'artrite reumatoide, obesità, il lupus, le reazioni acute da trapianto, l'encefalomielite, psoriasi, morbo di Crohn, colite ulcerosa. Esistono ormai farmaci in grado di inibire queste molecole, non solo TNF,ma anche per es PAF, LAILA [*non sono sicuro NdR*]. I farmaci vanno ad inibire i linfociti B che producono autoanticorpi in queste patologie, le proteine LAILA importanti nell'osteoporosi, TRAIL per il cancro, linfotossine per le malattie autoimmuni e altre ancora.

Esistono anche patogeni che si difendono da queste citochine, vari virus come *Poxvirus*, *Herpesvirus*, che codificano per delle proteine virali che sono in grado di inibire le azioni biologiche di alcuni della famiglia del TNF, per esempio i *Mixomavirus* che producono un proprio TNFR2 solubile che blocca il TNF e la linfotossina α, i *Cowpoxvirus* che producono CD30 solubili inibitori del CD30L: sono proteine che agiscono a livello extracellulare che, codificate dai virus, possono andare ad interferire con la cascata di trasduzione attivata dai recettori.

Per quanto riguarda *Herpesvirus*, EBV, che porta a patologie dei linfociti B, codifica per tutta una serie di proteine che vanno a mimare l'azione del CD40; ad es. EBV codifica per una proteina simile al TRAF che si va a legare sulla membrana e manda un segnale di trasduzione incontrollato, continuo, costitutivo per la proliferazione dei linfociti B, dando varie malattie tra cui tumori.

Quindi, studiando i meccanismi di evasione immunitaria da parte dei patogeni possiamo capire il ruolo dei componenti di trasduzione attivati da questi recettori.

Infine, esistono alcune malattie genetiche associate a mutazioni di questi fattori, ad esempio della famiglia del TNF. Sono malattie molto rare, ad esempio a carico di FAS si ha la sindrome

linfoproliferativa, in cui FAS diventa inattivo e FAS-L non è più in grado di uccidere i linfociti attivi che continuano a proliferare, dando una proliferazione incontrollata di linfociti che può poi degenerare in malattie autoimmunitarie.

Domanda: i recettori decoy potrebbero essere usati anche al posto degli Ab monoclonali?

Risposta prof: certamente, i recettori decoy *sono* sfruttati, vengono prodotti dei recettori decoy ricombinanti che sono poi sfruttati nella terapia. Ad esempio i recettori solubili contro il TNF non sono altro che forme ricombinanti adattate.

Domanda: qual è il criterio di scelta tra un anticorpo e un recettore decoy?

Risposta prof: sono più che altro problemi farmacologici. I recettori decoy sono poco stabili, gli anticorpi sono molto più stabili, inoltre le molecole ricombinanti sono molto più dannose degli anticorpi, però poi questi ultimi possono provocare effetti collaterali di un tipo mentre i *decoy receptor* di altri, senza contare che vi sono poi delle differenze nelle risposte provocate dall'uno o dall'altro.

IL-6

Altra citochina proinfiammatoria importante, anche se secondaria, è IL-6.

INDOTTA DA:diverse citochine, ad esempio dallo stesso TNF o da IL-1

PRODOTTA PRINCIPALMENTE dai fagociti (in elevate quantità, ma anche altre cellule la producono) da cui è direttamente secreta.

RECETTORE: Lega un recettore eterotrimerico composto da una catena specifica, detta IL-6Rα che è quella che lega direttamente la citochina, che poi si complessa con 2 catene di gp130 (comune anche agli altri recettori che legano i membri della famiglia dell'IL-6) che è la catena che dà il segnale intracellulare.

SIGNALING: Per quanto riguarda il signaling, esso fosforila Jak2 *(2 o 3 il prof non è sicuro NdR)* e poi STAT3, che è lo STAT specifico per il segnale dell'IL-6.

NOMI: Quest'interleuchina è conosciuta anche con altri nomi, assegnati prima che si completasse il clonaggio e la classificazione, ad esempio B-cell stimulatory factor 2, IFN-β2, hybridoma/plasmacytoma growth factor.

E' importante perché è in grado di stimolare la proliferazione delle plasmacellule e delle cellule epatiche del fegato; attiva molte vie di trasduzione, importante per l'attivazione di STAT3 che fa

quindi partire la via RAF,MEK,ERK (cioè MAP chinasi) che è in grado di attivare la trascrizione di varie proteine bersaglio.

TRANS SIGNALING

E' inoltre importante perché, oltre a funzionare con un segnale classico, cioè con una IL-6 solubile che aggancia il recettore e attiva il segnale, esiste anche il *trans-signaling*, cioè la capacità di attivare cellule che non hanno la catena α: in questo caso è possibile che la forma solubile della catena α, rilasciata da varie cellule come i neutrofili, invece di avere azione neutralizzante può legare la IL-6, complessarsi e agganciare una cellula che non ha il recettore α sulla membrana, ma il recettore gp130, quindi attivare il segnale.

Quindi i recettori solubili non è detto che abbiano per forza un'azione neutralizzante, potrebbero anche funzionare in generale; ad ogni modo, in questo caso, permettono ad una cellula che non ha la catena alfa specifica di agganciare l'IL-6 con questo meccanismo. Questo avviene ad esempio nelle cellule endoteliali.

L'espressione di IL-6 è regolata da NF-kB, AP1, CBPβ (altro fattore di trascrizione importante).

Quindi possiamo avere il signaling classico, come in una cellula epatica che possiede la catena α, oppure con il *trans-signaling* in cui il recettore solubile lega IL-6 e la porta a complessarsi con il gp130 permettendo a questa cellula di rispondere.

INIBIZIONE DEL TRANS-SIGNALING:

Sulla base di questi meccanismi si delinea la possibilità di inibire questo trans-*signaling*, utilizzando sgp130 (cioè quello solubile) in grande eccesso, in modo che si complessi con i recettori solubili dell'IL-6 prima ancora che essa vada a legarsi sulla cellula che non ha la catena α. Quindi possiamo inibire il signaling classico con gli anticorpi, ma possiamo anche bloccare il *TRANS- signaling* andando ad utilizzare un largo eccesso della molecola solubile.

La cosa interessante a questo proposito è che quando è stata clonata IL-12, che è formata da 2 catene (p40 e p35), è stata la prima citochina eterodimerica ad essere scoperta; inoltre non si riusciva a sequenziarla perché si credeva fosse prodotta da un unico enzima, invece era codificata da 2 enzimi e solo la forma eterodimerica ha attività biologica. A questo proposito, la p40 ha una forte omologia con il recettore α dell'IL-6, quindi si pensava che IL-12 (ma anche IL-23 e IL-27) derivasse da una modificazione del sIL-6R e che quindi fosse un *recettore* solubile in grado di attivare la trasduzione cellulare.

INNESCO DELLA PRODUZIONE DI IL 6: TNF, LTS, PAF;

FATTORI CHE SONO IN GRADO DI DIMINUIRNE L'ESPRESSIONE come glucocorticoidi, altre citochine, IgE, citochine antiinfiammatorie (IL-4, 10, 13)

AZIONI BIOLOGICHE:

È molto importante perché agisce a livello del sistema immunitario per la maturazione dei linfociti B e l'attivazione dei linfociti T, del fegato stimolando la produzione di proteine di fase acuta, importante per l'ematopoiesi, e anche a livello del SNC perché contribuisce a provocare la febbre.

PROTEINE DI FASE ACUTA:

Per quanto riguarda le proteine della fase acuta, esse sono una lunga serie, come ceruloplasmina, proteine del complemento, inoressina, che durante una risposta infiammatoria aumentano tantissimo a livello di concentrazione plasmatica: aumento del 50% della ceruloplasmina, aumento di centinaia di volte della proteina C reattiva (mentre altre diminuiscono, come l'albumina, perché il fegato è impegnato a secernere altre proteine).

Le proteine della fase acuta sono prodotte a partire da un preciso programma trascrizionale del fegato, attivato soprattutto da IL-6, ma non è l'unica: anche IL-1, TNF e IFN-α.

La funzione di queste proteine è difensiva, per potenziare le risposte verso gli agenti patogeni interferendo in particolare con processi quali la loro nutrizione e replicazione.*[riducono i pool sierici, riducono la biodisponibilità per gli agenti infettivi degli oligoelementi, potenziano le risposte anti-infettive NdR]*

Sono molto utili per noi medici perché ci permettono, se c'è un sospetto di una patologia infiammatoria, di confermarla in base all'aumento di queste proteine (es. proteina C reattiva, SA) oltre all'aumento dei leucociti, per esempio di neutrofili, e della VES (velocità di sedimentazione che è condizionata dalle proteine). Quando la situazione si risolve, le proteine diminuiscono, l'infiammazione cala e i leucociti si normalizzano.

Ricordiamo che la *gran parte* delle proteine della fase acuta sono indotte da IL-6, anche se non tutte: queste altre sono indotte da IL-1, TNF (alcune sono condivise).

Alcune proteine di fase acuta:

- SIERUM AMYLOID PROTEIN (fa parte delle pentrassine, importante nella difesa immunitaria innata; è una proteina amiloide, si può depositare)

- PROTEINA C REATTIVA (ruolo non è ben noto, ma si conosce la sua azione di opsonina, favorisce quindi la fagocitosi);

- FIBRINOGENO

- MANNOSE BINDING LECTIN (responsabile della terza via di attivazione del complemento);

Sono tutte proteine di fase acuta la cui produzione a partire da trascrizione è ben conosciuta. L'albumina è la proteina più rappresentata nel plasma, 4-5g, ed è importante per la pressione osmotica; durante una patologia infiammatoria la sua concentrazione diminuisce.

ALTRE AZIONI BIOLOGICHE DI IL6:

Altre azioni biologiche dell'IL-6:

- Differenziamento plasmacellule;
- agisce a livello degli osteoclasti per il riassorbimento osseo;
- aumenta l'espressione delle molecole di adesione delle cellule endoteliali;
- media il collegamento tra infiammazione e cancro (proliferazione cellule umoriali, sviluppo di tumori che nascono dall'infiammazione);
- favorisce la differenziazione dei macrofagi;
- attiva gli epatociti;
- svolge azioni a livello dei linfociti.

AZIONE SUI LINFOCITI T

In particolare nei linfociti T per la differenziazione ed è in grado di indurre la proliferazione delle plasmacellule (ecco perché sostiene il plasmacitoma nel mieloma multiplo). Invece inibisce la differenziazione dei linfociti T regolatori e svolge un'azione modulatoria sulla polarizzazione dei linfociti T helper.

Per quanto riguarda i linfociti, IL-6 assieme a IL-1 e TGF-β costituisce un ambiente che favorisce la polarizzazione dei linfociti verso T_H17, importanti per i meccanismi di difesa contro i batteri extracellulari e in alcune patologie autoimmunitarie quando vi è un'alterata regolazione di queste cellule.

IL-6 ha un ruolo fondamentale nella polarizzazione dei linfociti naïve nel momento in cui c'è TGF-β, ovvero la citochina più importante nello sviluppo dei T_{reg}, ma contribuisce anche alla polarizzazione dei T_H17: se c'è dunque IL-6 nell'ambiente, inibisce la formazione dei Treg favorendo la polarizzazione verso T_H17. Quindi IL-6 fa prendere la decisione: quando c'è TGF-β, IL-6 fa maturazione verso T_H17 e impedisce la differenziazione verso T_{reg}, se manca IL-6 TGF-β è libero di agire e promuovere i T_{reg}, che hanno ruolo soppressorio o comunque di regolazione per la risposta immunitaria.

Nell'immagine successiva si può vedere un grafico delle sostanze che inducono la polarizzazione verso un tipo di linfocita maturo piuttosto che un altro a partire dal linfocita T naive: T_H1 è indotto da IL-12 e produce IFN-γ; T_H2 maturano se c'è IL-4 e producono a loro volta IL-4 assieme ad altre citochine come IL-5, 9, 13; poi T_H17 e T_{reg} che possono essere entrambi promossi da TGF-β, ma se è presente IL-6 si formano i T_H17; se c'è IL-10 vengono polarizzati verso T_{reg} i quali producono ancora TGF-β e IL-10 con azione immunosoppressoria.

EFFETTI RIDONDANTI O PLEIOTROPICI

Vi sono diversi **effetti ridondanti o pleiotropici** di TNFα, IL-1 e IL-6: alcuni sono comuni alle tre, come l'aumento della permeabilità vascolare, dell'espressione di molecole di adesione, delle chemochine, l'innesco delle proteine di fase acuta (promosso appunto da queste citochine più IFN-α).

Altri sono specifici, come IL-6 pirogeno endogeno, o aumento della sintesi di immunoglobuline o proliferazione di fibroblasti.

PATOLOGIE ASSOCIATE A IL6

Una produzione incontrollata di questa molecola può essere implicata in una serie di malattie:

- disordini ematologici (leucocitosi, anemia, trombocitosi)
- alterazione delle ossa e delle cartilagini;
- malattie infiammatorie acute e croniche (amiloidosi, ecc);
- autoimmunità;
- malattie proliferative (tumori soprattutto a cellule B, in particolare plasmacellule);
- malattie immunologiche, legate ad una alterazione dell'azione dell'IL-6 soprattutto sui linfociti T.

Come per le altre citochine esistono dei farmaci in grado di bloccare IL-6: Ab monoclonali contro IL-6 o contro il recettore, oppure la gp130 ricombinante solubile (per bloccare il transsignaling).

Trovano applicazione in artrite reumatoide, soprattutto quella giovanile (si segue un protocollo, prima si prova a bloccare TNF, poi IL-6), malattie sistemiche autoimmuni, malattie infiammatorie croniche, alcuni tumori come il mieloma multiplo (alcuni, plasmacitoidi, sono sostenuti da IL-6 e addirittura si autosostengono producendo lo stesso fattore di crescita) e quindi a riguardo si potrebbe bloccare la proliferazione di questo tipo tumorale arrestando l'azione della citochina.

FARMACI BIOLOGICI

Esistono anche oggi dei farmaci in grado di inibire le azioni biologiche degli altri membri della famiglia, come IL-11 e leucostatina [*non si capisce bene, NdR*]. Esistono dei farmaci *biologici*, cioè che vanno a bloccare in maniera specifica quella determinata molecola che ha un'azione biologica, ma anche un ruolo patologico: sono farmaci anche costosi, che sono usati in numerose patologie perché molto potenti e includono inibitori del TNF, dell'IL-1, dell'IL-6 e anche altri farmaci che agiscono su molecole espresse da linfociti T o B. Ci sono ancora *biological therapeutics* anti-TNF, cioè farmaci che bloccano il TNF in varie fasi.

CHEMOCHINE (ne ha già parlato nel primo semestre)

Sono altre citochine fondamentali nella risposta infiammatoria [*importante imparare la classificazione, la nomenclatura ufficiale, il nome originale, la funzione, il recettore, NdR*].

FATTORI DI CRESCITA (GSF: growth stimulating factor)

Sono i Colony Stimulating Factors (CSF), importanti anch'essi per la risposta infiammatoria acuta e cronica. Le cellule differenziate del sangue derivano dai precursori immaturi del midollo (cellule staminali pluripotenti) che danno origine, attraverso una serie di tappe di differenziamento, ad un precursore linfoide oppure mieloide.

Il **precursore linfoide** dà origine ai linfociti T, B e agli NK;

Il **precursore mieloide** dà origine alle cellule mieloidi che sono granulociti, monociti, le cellule dendritiche e altre cellule del sangue (eritrociti, megacariociti da cui derivano le piasrine).

Grazie alle colorazioni si può osservare che le cellule immature hanno un rapporto nucleo/citoplasma molto elevato, cioè con nucleo grande e poco citoplasma; poi maturano e danno origine per quanto riguarda i granulociti a neutrofili, eosinofili, basofili, per i monociti escono dai vasi, entrano nei tessuti e si sviluppano in macrofagi, per i linfociti si trovano linfociti T, B e NK [*importante osservare la colorazione, la morfologia, la dimensione, il rapporto nucleo/citoplasma NdR*].

FATTORI CHE INFLUENZANO LA MATURAZIONE

Queste tappe sono condizionate da fattori di crescita e citochine: una citochina fondamentale per la maturazione della linea linfoide è IL-7, per le NK in particolare è specifica IL-15.

Il progenitore immaturo si può isolare poiché possiede il marcatore CD34, quindi si possono identificare le cellule $CD34^+$ anche nel sangue, isolarle e utilizzarle in vitro.

Poi si vedono una serie di citochine e fattori di crescita responsabili dell'indirizzamento alla linea mieloide: IL-17, IL-3, IL-5, GM-CSF; in seguito il progenitore mieloide darà origine, grazie ad una miscela di fattori e attraverso diverse tappe maturative, alle cellule mature.

Per la maturazione dei mastociti ci sono CSF specifici che sono cruciali per il differenziamento: per i basofili IL-3, per gli eosinofili IL-5, per i neutrofili molto importante il G-CSF e per quanto riguarda i monociti il GM-CSF o anche M-CSF1. Per le cellule dendritiche il GM-CSF è importante, ma anche CR3KL (central receptor 3 kindlin ligand [*non sono sicuro NdR*]).

Per concludere è importante tenere a mente che non è una sola citochina a far differenziare, ma è la *combinazione* di più citochine.

Ci sono comunque delle citochine che, man mano che la cellula matura, diventano sempre più importanti: IL-5 per i neutrofili, M-CSF per i monociti, IL-17 per i neutrofili; poi altre citochine molto specifiche come l'eritropoietina per gli eritrociti e la trombopoietina per le piastrine, scoperta nel 1999 e in pochi anni già entrata in terapia, dalla ricerca di base alla situazione clinica, perché non c'è nessun altro farmaco che abbia un'azione migliore sulle piastrine.

Lezione di Patologia generale e fisiopatologia clinica (sem2) del 20/3/2013 (1)

Sbobinatore: Luca Faccioli

Professore: Pietro Minuz

Data: 20/03/2013

Scompenso cardiaco (continuazione)

In ogni condizione di iniziale riduzione della riserva funzionale cardiaca, da parte dell'organismo si instaurano meccanismi di compenso che sono anche l'esasperazione delle normali risposte fisiologiche alle variazioni delle necessità metaboliche dell'organismo che aumentano: ad esempio, se si compie dell'attività fisica la frequenza cardiaca aumenta, come anche l'inotropismo (forza di contrazione) e il riempimento delle camere cardiache per via dell'attivazione adrenergica.

In una situazione di insufficienza cardiaca questo quadro compensatorio compare molto precocemente, ossia quando si riduce la riserva funzionale la tachicardia compare prima, come l'accelerazione del riempimento delle camere cardiache (come meccanismo compensatorio del

deficit esistente). Anche il maggior riempimento in fase diastolica compare per questo (soprattutto in telediastole), per compensare l'alterata funzionalità sistolica.

Un altro meccanismo di adattamento di tipo "speculare" che passa attraverso la variazione delle dimensioni delle camere cardiache attraverso il rimodellamento della parete del cuore; in quest'ottica possiamo definire due distinte situazioni:

- meccanismi di alterato precarico, ossia che portano a un maggiore riempimento, o di alterato postcarico (ossia risultanti in un eccesso di pressione in camere cardiache o di pressione arteriosa), portano o a un'ipertrofia cardiaca di tipo eccentrico con un aumento in serie dei sarcomeri (risultante nell'allungamento delle camere cardiache con spessore di parete che si mantiene in rapporto normalizzato tra spessore della parete e volume delle camere cardiache che tende a alterarsi);
- dove prevale invece l'aumento dello spessore di parete per effetto dell'aumento della pressione arteriosa si ha un'ipertrofia di tipo concentrico anche a scapito del volume delle camere nelle fasi avanzate.

I due meccanismi di alterazione del cuore sono guidate da una serie di fattori:

-per esempio dalla trasduzione di segnale dai meccanocettori e dai recettori sensibili allo stress di parete;

-fattori come sovraccarico di volume, sovraccarico di pressione;

-fattori demografici come l'età favoriscono lo sviluppo dell'ipertrofia eccentrica; il genere maschile e alcune etnie sono maggiormente esposti al rischio di ipertrofia concentrica;

-ma sopratutto condizioni patologiche come diabete, obesità, malattie intrinseche al cuore come la cardiopatia ischemica per occlusione di un vaso coronarico, malattie alle valvole cardiache che modificano i volumi di riempimento o ostacolano il flusso del sangue nelle camere cardiache;

-fattori legati alla genetica portano una ridotta efficacia attività contrattile danno ipertrofia di tipo concentrico;

-altri fattori legati sempre alla genetica modificano le funzionalità della cellula cardiaca;

-alterazioni della struttura del supporto citoscheletrico delle cellule miocardiche danno difficilmente un'ipertrofia di tipo eccentrica;

-infine ci sono malattie di accumulo che portano ad un'alterazione strutturale del miocardio causando alterata contrattilità o un'alterata distensibilità in diastole.

Quindi molti fattori portano da una parte all'ipertrofia di tipo eccentrico e dall'altra parte a ipertrofia di tipo concentrico; si tenga presente per esempio che molte volte dall'ipertrofia

concentrica si passa a una forma eccentrica in seguito al rimodellamento strutturale miocardico da ipertrofia concentrica a ipertrofia eccentrica con dilatazione delle camere cardiache.

L'ipertrofia qualche decennio fa era detta adattativa nel caso fosse concentrica e mal-adattiva nel caso fosse di tipo eccentrico; attualmente invece la presenza di ipertrofia equivale a dimostrare una condizione di insufficienza cardiaca e di inizio di scompenso cardiaco in entrambi i casi, in quanto questa si accompagna sempre a un eccesso di mortalità.

Vi sono una serie di segnali che quindi contribuiscono a questi quadri clinici: i recettori di stiramento, fattori crescita, recettori dell'angiotensina II e per l'endotelina, recettori beta-adrenergici, recettori per le citochine; tutti questi determinano una serie di eventi che per mezzo della trascrizione genica portano a un diverso fenotipo della cellula muscolare. La cellula muscolare tende a cambiare il suo fenotipo: tipico delle forme di ipertrofia è la comparsa miofibrille di tipo alfa o fetale; i fattori di crescita determinano non solo sulle cellule muscolari, ma anche su sulle cellule circostanti (fibroblasti), la formazione di miofibroblasti su cellule muscolari; tutto questo provoca la deposizione di matrice extracellulare, e il rimodellamento strutturale per mezzo di enzimi come le metalloproteasi che portano alla rimodellazione della matrice extracellulare.

L'ipertrofia è dunque complesso come processo, infatti è tipico osservare ramificazione della composizione delle fibrille nelle cellule miocardiche, alterata risposta cellulare agli stimoli, modificazione dell'irrorazione, più rigidità delle cellule muscolari per alterazioni citoscheletriche, riarrangiamento strutturale anche con fenomeni apoptotici delle cellule muscolari. Aumenta l'ambiente extracellulare rispetto alla componente muscolare. Si trovano un'alterata funzione endoteliale con secrezione di ossido nitrico e mediatori di endotelio che sono anche dei regolatori della contrattilità miocardica oltre che di crescita cellulare tipo su cellule della parete vascolare. Inoltre si aggiunge spesso (o per la condizione di malattia sottostante o perché innescata in ambito di questo processo) un processo infiammatorio con l'azione di citochine che determinano ulteriore evoluzione del processo ipertrofico; questo si accompagna con modificazione all'irrorazione miocardica (che è più rarefatta in relazione all'irrorazione di un cuore non scompensato). In sintesi, il processo ipertrofico porta a un cuore più grosso e che pesa di più, ma che è meno efficiente per unità di massa (si riduce la forza contrattile e aumenta la rigidità parete).

Sia nelle forme di scompenso causate dalla rigidità della parete, cioè nelle forme di disfunzione di tipo diastolico (in cui prevale l'aspetto di incapacità di distendere in fase diastolica), sia in forme di deficit contrattilità, i due fenomeni tendono a esser intersecati, ossia non c'è forma con diminuita capacità contrattile senza minore capacità di distensione, e viceversa.

C'è un importante evento che segna il passaggio dalla riduzione di riserva funzionale a scompenso cardiaco ed è una manifestazione curiosamente extra-cardiaca, cioè la ritenzione idro-salina: la classica manifestazione dello scompenso è la comparsa dell'edema. Accade che giorno per giorno un lieve deficit, anche modesto, di riempimento del circolo arterioso (si ricordi il

concetto di circolo efficace, ossia un volume adeguato di riempimento del circolo arterioso che mantiene un equilibrio rispetto ai meccanismi di compenso). In una situazione di scompenso un adeguato riempimento arterioso non si verifica, c'è la percezione di minore riempimento arterioso dimostrato dall'attivazione adrenergica. Il circolo è comunque inefficace rispetto alle necessità metaboliche perché il cuore non è in grado di supplire alle necessità del circolo arterioso. Si può osservare la conseguenza di questa incapacità guardando cosa succede a livello renale per capire in che modo si arriva all'edema. In una situazione di scompenso cardiaco, i reni sono perennemente ipoperfusi. Un meccanismo che porta all'adattamento del circolo intrarenale in questo caso è quello che dall'apparato iuxtaglomerulare del rene viene rilasciata renina, che andrà ad agire sull'angiotensinogeno convertendolo in angiotensina I, convertita poi in angiotensina II da un enzima che noto come angiotensin converting enzyme , ACE. Tutto questo apparato enzimatico è presente sull'arteriola efferente a monte glomerulo.

L'angiotensina II rilasciata agisce principalmente localmente (sul circolo renale) determinando vasocostrizione, ma persiste in circolo molto tempo (a differenza di prostacicline e NO, che sono rapidamente inattivati localmente) e se le sue concentrazioni aumentano si comporta come ormone a distanza, agisce su cellule muscolari lisce come bersagli, ma quest'ormone è anche al primo posto tra i fattori di rimodellamento cardiaco e vascolare.

Nello scompenso cardiaco abbiamo quindi ipersecrezione della renina e quindi dell'angiotensina II, che è il principale regolatore determinante sintesi e secrezione di aldosterone dalla zona glomerulosa della corticale del surrene, attivando cascata metabolica che dal colesterolo porta alla sintesi di aldosterone. Quest'ormone agisce sul tubulo del rene determinando ritenzione di sodio per mezzo di una maggiore espressione e capacità di trasporto dei canali apicali del sodio espressi sul tubulo distale, portando quindi a ritenzione di acqua che segue la ritenzione del sodio.

Questo sarebbe un utile meccanismo di compenso, da un punto di vista finalistico, in quanto accade sempre nell'ipoperfusione renale, e perché determina un miglior riempimento delle camere cardiache permettendo una miglior impiego del sangue per la funzione renale. Nella realtà chiaramente non può essere una soluzione permanente ed è noto dall'antichità che la ritenzione idrica sia una condizione da ridurre (ad esempio con salassi, o con uso di composti a funzione diuretica). La ritenzione idrica è un meccasnismo parafisiologico, ed è lo stesso messo in atto in casi di disidratatazione od emorragia, casi in cui vista la condizione "acuta" degli eventi il raggiungimento dell'equilibrio è possibile. In caso però di scompenso cardiaco, caso in cui l'equilibrio non è mai raggiungibile, alla fine questo meccanismo compensatorio peggiora la funzionalità cardiaca stessa e si ha un cronico bilancio positivo di sodio e acqua.

Il rene tende a aumentare i volumi extracellulari e intravasali, portando a un cronico aumento di sodio e acqua che tenderebbe all'infinito. Il compenso intrarenale consiste nel fatto che aumentando di molto i volumi riassorbiti si arriva a una migliore perfusione glomerulare, quindi ad avere più filtrazione, portando ad una migliore capacità di eliminare acqua e sodio; ma, a differenza di quel che avviene con l'aumento di pressione (che se sale avrò a un certo punto più eliminazione di sodio e acqua raggiungendo un equilibrio), con la ritenzione idro-salina ciò non avviene mai. Un tempo i soggetti con scompenso trovavano la morte per un eccesso smisurato dei volumi (le manifestazioni più frequenti erano edemi distali, raccolta di liquidi nel terzo spazio, versamento ascitico e pleurico, che è incompatibile con la vita).

Altre condizioni con analoghe ritenzioni idrosaline sono anche l'insufficienza epatica (dove l'edema diventa massivo), e la sindrome nefrosica. Il rene è estremamente sensibile alle variazioni di riempimento vascolare ossia al volume efficace, cioè percezione di sistemi barorecettoriali di circolo sistemico e intrarenale determina attivazione adrenergica da una parte e il rilascio di renina dall'altra. Il rene è un ottimo sensore da questo punti di vista, quindi la comparsa di ritenzione è la più evidente manifestazione di scompenso cardiaco, e si colloca precocemente alle altre manifestazioni dello scompenso. Gli altri segni precoci sono un maggior riempimento delle camere, poi l'attivazione adrenergica; il terzo segno dello scompenso in ordine di tempo è dato dal rilascio di renina.

In una qualsiasi immagine di sezione di un glomerulo renale è ben evidente: l'arteriola afferente e le cellule dell'apparato iuxtaglomerulare, le cellule dell'interstizio, muscolari lisce, che percepiscono segnali di maggior o minor stress sulla parete. Detto ciò, nel caso in cui si formi angiotensina II, questa agisce sulle cellule muscolari dell'arteriola efferente dando vasocostrizione (quindi bassa pressione di perfusione a valle), aumenta la pressione intraglomerulare e modifica in senso positivo l'ultrafiltrazione portando ad un maggiore differenziale tra il lume vascolare e l'interstizio, e così l'ultrafiltrato (plasma senza proteine) esce dalla capsula di Bowmann per entrare nel tubulo renale, determinando un miglioramento della filtrazione glomerulare.

I meccanismi a valle (riassorbimento di sodio in tubulo prossimale e distale) determinano recupero acqua e sodio; ciò, aggiunto al fatto che si arriva a avere un iperaldosteronismo secondario (quello primario è dato da condizione intraghiandolare per adenoma ghiandolare); l'eccesso di renina porta a eccesso di angiotensina e all'eccesso di aldosterone che quindi è secondario. Il risultato è che filtrato viene mantenuto e quindi certe sostanze si eliminano senza accumularsi, ma nel metabolismo del sodio si favorisce in tutto il tubulo il suo riassorbimento (insieme all'acqua). Questo riassorbimento provoca l'espansione dei volumi che aumentano giorno per giorno e non si arriva mai a un equilibrio; perché il cuore non pompa adeguatamente, anzi alla fine supera i limiti di distensione.

La percezione che questo sia un momento determinante della progressione rapida dello scompenso, risale a molto fa, forse all'inizio delle capacità cognitive umane; un paziente con scompenso cardiaco ha un enorme volume in eccesso di acqua visibile, e grazie alla terapia medica non si vede più ciò che succedeva non molti anni fa (quando le persone non erano trattate come adesso). L'incremento di peso poteva essere anche dell'ordine di decine di litri.

Quindi è sempre l'eccesso di angiotensina II la responsabile primaria di questo disastro di volume; l'angiotensina è però anche un fattore di crescita e vasocostrittore potente, responsabile anche di alterazioni funzionali e strutturali del rimodellamento e fibrosi interstiziale del cuore. Inoltre coopera e sinergizza con l'attivazione adrenergica nella vasocostrizione periferica, aumenta il sodio nella porzione prossimale del tubulo renale, coopera con aldosterone per il riassorbimento nella porzione distale del tubulo; l'angiotensina è responsabile anche della sensazione di sete, quindi il soggetto tende a assumere più acqua aggravando ulteriormente la situazione.

Quindi l'angiotensina II è responsabile di tre aspetti critici per determinare progresso scompenso (ossia ipertrofia cardiaca, ritenzione idro-salina, vasocostrizione periferica) e non deve stupire il

fatto che la svolta nella terapia dello scompenso c'è stata non molto tempo fa con una scoperta casuale di sostanze in grado bloccare l'enzima **ACE**, quindi la storia dello scompenso è cambiata drasticamente; ci sono ancora condizioni di edema associato a scompenso, ancora situazioni di edema polmonare, ma raramente si ritrovano le condizioni gravissime che fino a 15 anni fa si vedevano nei reparti.

Un altro aspetto tipico dell'attivazione adrenergica che porta vasocostrizione in una situazione di scompenso cardiaco è la **ridistribuzione del flusso**: il distretto cutaneo muscolare è il primo ad essere ipoperfuso, questo dà deficit di performance fisica in scompenso cardiaco, il grado di progressione della malattia è dato dal grado di deficit fisico (un soggetto con scompenso in grado di camminare e salire scale ha ancora una discreta funzionalità cardiaca).

La redistribuzione dei flussi peggiora di più il deficit muscolare e la capacità di risposta allo sforzo fisico; la vasocostrizione aumenta il lavoro cardiaco *(aumenta la pressione a monte)* e riduce la capacità di lavoro fisico; qui sono riassunti (vedisi slide di riferimento con tabella di valori) gli adattamenti nei valori neurormonali che si accompagnano allo scompenso: attivazione adrenergica, attivazione angiotensina II, presenza di citochine proinfiammatore, accompagnano molte delle condizioni di causa dello scompenso cardiaco (per esempio diabete, cardiopatia ischemica, aterosclerosi). La risposta innata che dà la flogosi aggrava il deficit di funzionalità e la capacità di svolger lavoro fisico.

Insieme a tutto questo c'è anche l'aumento di secrezione di **ANP** o peptidi natriuretici atriali. I peptidi natriuretici atriali sono secreti in risposta all'aumento di stress di parete sia a livello dell'atrio destro (inizialmente pensata come sede sintesi di questi peptidi) che dei ventricoli (soprattutto il sinistro). Lo stress di parete è la pressione che si determina in modo circostriziale determinata dal rapporto di volumi e spessore di parete. Dove si verifica molto stress di parete vengono rilasciati questi peptidi che vanno in circolo, agendo su bersagli a distanza (anche sul muscolo cardiaco ove aumentano contrattilità). Il principale effetto però è che agiscono sul tubulo renale modulando la funzionalità dei trasportatori del sodio, praticamente sono gli unici meccanismi che controbilanciano la ritenzione del sodio nello scompenso cardiaco, tanto più si procede verso una situazione di grave scompenso, tanto più aumenta il rilascio di questi peptidi che agiscono a livello del rene sui livelli di GMPC. Sulle cellule muscolari lisce determinano vasodilatazione intrarenale, e aumentano l'espulsione di sodio. Tirando le somme sono gli ANP sono unici diuretici dell'organismo in grado di controbilanciare il guadagno senza fine.

Quindi si determina una situazione che inizia con insufficienza contrattile e perdita di output, quindi ridotto flusso renale, ipotensione, attivazione adrenergica, vasocostrizione e aumento resistenze come meccanismi di compenso che aumentano il lavoro cardiaco.

La prima causa perché si determini lo scompenso è che ci sia un danno alla struttura miocardica (difetto di contrattilità, forme congenite, difetto di ancoraggio di sarcomeri a citoscheletro), quindi l'insufficienza miocardica può essere la prima causa di scompenso, ma ci possono essere anche condizioni in cui il cuore funziona bene ma si determinano eccessi di volumi o pressioni. Ad

esempio un eccesso di pressione avviene nel caso dell'ipertensione arteriosa, oppure se si rompono o si consumano a causa di processi infiammatori i lembi di una valvola (ad es la mitralica) si ha eccesso di sangue (che invece di esser gettato in aorta torna nell'atrio sinistro) e resta più volume in tutte le fasi del ciclo, soprattutto in fase presistolica, quindi si determina eccesso generale di volumi.

Nell'ipertensione si ha uno scompenso acuto di cuore perchè quest'organo non è in grado di sopperire all'eccesso di pressione. Inoltre il circolo può esser inadeguato, con poco volume di riempimento per un'emorragia, aumentando frequenza io non raggiungo equilibrio se non ripristino volumi. Stessa cosa se ho shock dove ho una riduzione delle pressioni con vasodilatazione e aumento di permeabilità a livello capillare, che determina deficit di ritorno venoso, poca pressione a valle col cuore che pompa a vuoto, con una cinetica sfavorevole perché poco riempito, contrae su piccoli volumi con pressioni molto basse. Si distinguono quindi cause intrinseche da cause secondarie.

Esempi più tipici:

-**Riduzione del precarico** con poco ritorno venoso, se si ha ostruzione o una perdita di volume, o trombo esteso o basso riempimento, il cuore di destra si riempie poco, nel circolo polmonare va poco sangue, nel cuore di sinistra il volume è ridotto, quindi l'efficienza del cuore di sinistra è ridotta e il circolo sistemico ne risente per la bassa gittata.

-Una condizione importante è l'**ostacolo a livello del circolo polmonare,** cuore destro sarà sopradisteso, però il riempimento del sinistro sarà invece ridotto; con atrio sinistro e ventricolo sinistro meno riempiti la gittata in avanti si riduce, quindi un'occlusione massiva del circolo arterioso polmonare determina shock.

Posso avere una alterazione del precarico (quindi un'insufficienza cardiaca di tipo diastolica perché è questa fase quella alterata) anche in tutte le condizioni dove c'è un'alterata distensibilità del cuore. Anche in fasi iniziali, il cuore ipertrofico di un iperteso è più rigido e ha un riempimento diastolico più lento, ma in alcune condizioni (cuore ischemico, cuore ipertrofico, fibrotico, flogistico, alterato geneticamente), avrà una capacità di distensione ridotta, e quindi la capacità di riempimento funzionale per svolgere attività fisica sarà ridotta. Alterazioni di precarico configurano un'alterazione della fase diastolica di riempimento. In queste condizioni essenzialmente il cuore è più rigido e a parità di volumi per riempirsi ha bisogno di pressioni più elevate; essendo ridotto il riempimento si riduce anche la gittata sistolica.

Nel grafico pressione/volume l'area sottesa da queste linee diventa molto piccola. In questa disfunzione diastolica quello che è caratteristico è lo squilibrio di maggiori pressioni a parità di volumi e questo condiziona le capacità contrattili (in verde condizioni normali, sul grafico).

-Una condizione di **alterazione del precarico** può essere data anche **da eccesso di volume.** Tipico esempio è un'insufficienza valvolare; se in queste condizioni si registrano pressioni e volumi, si possono osservare valori molto elevati, e non avrò nessun guadagno in contrattilità, quindi una proporzionale riduzione di frazione di eiezione in fase sistolica perché una parte del sangue resta nelle camere cardiache. L'insufficienza mitralica è rappresentativa di tutto questo, con un

progressivo aumento di volume residuo, perché aumentando il volume diastolico, aumentano anche le pressioni, la contrattilità miocardica non si adegua al volume aumentato, e aumenta proporzionalmente il volume che resta alla fine della sistole, diminuendo quindi frazione di eiezione.

Il sovraccarico di volume è dato anche da altre condizioni, l'insufficienza renale si accompagna a un aumento di pressione, e un maggior incremento proporzionale di volume (attenzione: non dà edema). Nonostante questo, l'eccesso di volume c'è quasi sempre, eccesso pressione porta spesso ad una progressiva perdita di capacità contrattile per l'aumento dei volumi riempimento. Quindi un eccesso di volume può determinare, all'arrivo all'appiattimento dell'incremento di contrattilità secondo la legge di Frank-Starling, le condizioni per cui i segnali trasdotti dai meccanocettori portano al rimodellano del cuore e quindi alla perdita di contrattilità con insufficienza cardiaca.

Una condizione di questo tipo appena descritta (eccesso di volume in cui si perde contrattilità) sono tipiche di scompensi di tipo sistolico, perché è questa la fase del ciclo che viene alterata. Il deficit sistolico accompagna anche incrementi del postcarico perché se in condizioni di riposo ho bisogno di tanta forza per pompare il sangue, in caso di esercizio fisico non ho possibilità di adattamento funzionale; questo nel tempo provoca alla struttura cardiaca quella serie di modifiche sopra descritte, per cui il cuore diventa inefficiente. Con elevato incremento di pressioni, la capacità di svolgere lavoro cardiaco tende a abbassarsi; in condizioni fisiologiche c'è un certo grado di tolleranza, la pressione può salire (fino a 160, 180, 200 in condizioni di sforzo estremo) e il lavoro cardiaco e l'adattamento aumentano in proporzione. Il cuore che deve affrontare una condizione sfavorevole di circolo, con pressioni elevate e parete rimodellata la capacità di adattamento funzionale sarà sempre più bassa. L'ipertensione arteriosa insieme al diabete sono tra le principali cause di scompenso cardiaco. L'ipertensione arteriosa che modifica i parametri circolatori a valle. Lo scompenso cardiaco del diabetico è dato principalmente da deficit contrattilità.

-Altro tipico esempio che porta a un grado elevato di **ipertrofia per alterato postcarico** è quello della **stenosi aortica**; in una stenosi molto serrata, per quanta forza abbia il cuore, esso non è in grado di superare l'ostacolo meccanico, a monte della stenosi ci sono alte pressioni in tutte fasi del ciclo, a valle invece c'è un basso riempimento e quindi un flusso ai tessuti molto più basso. Un aspetto di stenosi aortica è la peculiare attivazione adrenergica: l'aumento del postcarico non determina maggior frequenza cardiaca a causa del rallentamento della fase sistolica, quindi la stenosi non da tachicardia. Nemmeno l'ipertensione provoca tachicardia (a causa dello spegnimento attivazione adrenergica perché i barocettori di alta pressione sono sovrastimolati). La stenosi aortica è una condizione molto critica, con basso riempimento, vasocostrizione periferica reni poco perfusi, cervello ipoperfuso, possibilità di perdere conoscenza al cambio di postura, e il lavoro per il cuore è enorme (per superare l'ostacolo meccanico).

Un'altra condizione è l'**aumento dell'onda di polso che accompagna la rigidità aortica** che porta ad aumento del lavoro cardiaco perché la malattia aterosclerotica si accompagna a un danno nel circolo coronarico che determina ipossia. E' una condizione che spesso si presenta insieme al rimodellamento della parete.

Quindi in queste forme dove si modifica il postcarico si determina ipertrofia, se questo prosegue nel tempo si arriva ad una fase dilatativa finale, infatti un soggetto iperteso ha cuore ipertrofico inizialmente, ma che alla fine diventa dilatato.

Per quanto riguarda la terminologia, la distinzione tra **disfunzione diastolica e sistolica**, sta nel fatto che la prima riguarda la fase di riempimento, mentre l'altra si riferisce alla fase di contrattilità.

Insufficienza renale o malattie respiratorie possono presentare lo scompenso in forma acuta, l'embolia polmonare determina uno scompenso acuto del cuore, così come una crisi ipertensiva; la forma cronica porta a malattie degenerative del miocardio, che permettono il manifestarsi dei meccanismi adattamento (rimodellamento etc…).

C'è anche da considerare interazione tra cuore di sinistra e di destra; a questo proposito è utile tener presente che il cuore di destra risente molto delle disfunzioni del circolo polmonare. Lo scompenso cardiaco è dovuto perlopiù da condizioni di bassa gittata, ma a volte è dato anche da condizioni di alta gittata, nelle quali il cuore lavora più della norma ma è insufficiente. La prima causa di questo è un eccesso di lavoro fisico (ma di solito ci si ferma prima di raggiungere questo punto); un'altra causa è l'anemia, con ipossia tissutale data dal fatto che ci sono pochi globuli rossi, poco ossigeno a tessuti; in questo modo lo stimolo del centro cardiorespiratorio determina un aumento dell'attività cardiaca, il circolo diventa ipercinetico ma l'apporto di ossigeno ai tessuti rimane basso, il cuore pompa di più e in presenza di ipossia e va in deficit di funzionalità. Anche nel caso di basse resistenze periferiche (ad esempio ipertiroidismo) con apertura di shunt; il cuore rende il circolo ipercinetico con molto consumo di ossigeno, crescono le necessità metaboliche e si può andare incontro a scompenso; sono comunque più comuni quelli a bassa gittata che non ad alta gittata.

Infine un ultimo caso di scompenso è quello dato dall'edema polmonare. Nei casi precedenti, se il cuore ha poca funzionalità la condizione porta ad un'ipoperfusione dei tessuti e il rene risponde con ritenzione di acqua e sodio. Se però immaginiamo di integrare tutto il sistema circolatorio, quindi camera di destra e di sinistra, cosa succederà se il cuore di sinistra non funziona e se questo accade anche molto rapidamente? In questo caso aumentano le pressioni nelle camere cardiache (ad esempio in seguito a una crisi ipertensiva), l'adattamento funzionale in questo caso è esaurito, e l'aumento di pressione nel ventricolo sinistro si ripercuote in un aumento di pressione nell'atrio di sinistra, e quindi aumenta in modo retrogrado la pressione fino alle vene polmonari e quindi nei capillari polmonari. Dunque si alterano gli equilibri a livello del circolo polmonare, la pressione idrostatica nel tratto venulare del circolo capillare aumenta. Il circolo polmonare normalmente ha basse pressioni di riempimento perché l'alveolo deve restare sempre asciutto (non c'è mai una fase di uscita dei liquidi in tratto arteriolare del capillare e rientro in tratto venulare, sempre del capillare polmonare): nel polmone la pressione idrostatica deve essere sempre inferiore a quella oncotica in tutti i tratti del percorso del capillare. Aumentando invece la pressione idrostatica esce liquido dal capillare, è un trasudato (esce il plasma e riempie l'alveolo); in questo caso si ha insufficienza respiratoria acuta secondaria a uno scompenso di cuore.

La condizione di riempimento alveolare parziale si ha quasi sempre in fase avanzata di scompenso cardiaco con elevata ritenzione idrosalina (è ovvio, succede per l'elevata pressione idrostatica), ma una brusca variazione di pressione idrostatica nel circolo capillare polmonare si ha quando aumentano velocemente le pressioni nel ventricolo sinistro e nell'atrio sinistro determinano fuoriuscita trasudato che riempie alveoli, è una condizione grave delle forme acute di scompenso cardiaco, si perde la funzione degli scambi aerei polmonari che determina ipossia che aggrava quella di base tipica dello scompenso, se non trattata è incompatibile con la vita.

Questo è l'edema polmonare, da distinguere da quello sistemico (dove in piccola parte c'è anche quello polmonare, ma l'edema polmonare definisce questo acuto fenomeno, dove le manifestazioni sono quelle di insufficienza acuta respiratoria e l'aria non può entrare in alveolo). Riassumendo: una riduzione di riserva cardiaca può dare un circolo vizioso con progressione verso stadi sempre più avanzati a causa di scompenso.

Uno dei criteri per valutare l'entità dell'insufficienza cardiaca è di valutare il rapporto tra pressioni e volumi fisiologici e quelli che si determinano in una condizione di questo tipo. Si determina nel tempo che il riempimento ventricolare verso la gittata cardiaca va a ridursi perché aumenta il riempimento ventricolare e si riduce il volume della gittata cardiaca.

(Vedisi grafico di riferimento nelle slide) Si fa sempre riferimento al ventricolo sinistro per semplificazione, nel grafico c'è un rapporto tra i volumi presistolici e i volumi in uscita dalla camera cardiaca in condizioni fisiologiche e patologiche. Questo rapporto passa da 70% (normalmente), fino a sotto il 40% in condizioni di grave insufficienza cardiaca. Questo è un criterio quantitativo che non legge unicamente le condizioni a prevalente disfunzione diastolica o quelle a alta gittata. Al di fuori di queste situazioni serve come utile riferimento per determinare l'entità di insufficienza cardiaca.

Lezione di Patologia generale e fisiopatologia clinica (sem2) del 25/3/2013 (1)

Lezione di Patologia del 25/03/2013

Sbobinatore: Simone Ferraro

Revisore: Enrico Prior

Prof. Marco Antonio Cassatella

LE CITOCHINE EMATOPOIETICHE

Si continua dalla lezione precedente con la trattazione delle citochine ematopoietiche, citochine che regolano la proliferazione e la differenziazione dei vari tipi leucocitari e delle cellule del sangue.

Qui di seguito gli **Haematopoietic Growth Factors** (da lui citati e presi in considerazione nel corso della lezione). (Slide 1)

M-CSF (Macrophage Colony Stimulating Factor), associato al gene CSF1. Farmaco Lanimostim.

GM-CSF, associato al gene CSF2. Farmaco Molgramostim.

G-CSF, associato al gene CSF3. Farmaco Filgrastim.

IL-3 o Multi-CSF, che agisce a livello della cellula poco differenziata.

Il professore legge pari pari il diagramma (slide 3 e 4) che schematizza l'ematopoiesi a partire da una cellula staminale.

A monte della cellula staminale entrano in gioco varie citochine, come IL-6. Importante l'IL-7 per la maturazione verso i linfociti T e B.

IL-15 è il fattore principale per la crescita delle cellule NK.

Segue una ulteriore tabella (slide 5) con varie citochine, principali fonti cellulari, principali funzioni.

Segue poi la tabella della slide 6 che tratta **citochine e Haematopoietic Growth Factors che influenzano la produzione e la differenziazione delle cellule midollo.**

Alcune di queste hanno un ruolo positivo, favoriscono la maturazione e altre che la inibiscono. Gli Interferoni, le TGF di solito sono famiglie di citochine inibitorie (alfa, beta). <u>Ci sono quindi molecole che potenziano la produzione dei leucociti, altre che regolano negativamente questo processo</u>. Da ricordare anche come fattore inibitorio la Mip-1-alfa (macrophage inflammatory protein 1 alfa) che corrisponde alla molecola CCL-3. <u>Questi fattori di crescita agiscono a livello del midollo per stimolare la maturazione dei precursori dei vari tipi dei leucociti.</u>

Va ricordato però che queste citochine possono agire anche sulle cellule mature. Si tratta di fattori attivatori molto potenti, hanno la capacità di prolungare la sopravvivenza, il mantenimento delle cellule mature e così facendo possono anche stimolare le cellule a svolgere determinate funzioni.

G-CSF, M-CSF, GM-CSF rappresentano dei potenti fattori di sopravvivenza dei neutrofili maturi. (Slide 7)

La struttura di alcuni dei loro **recettori** è trattata nello schema della slide 8. I recettori per i vari CSF presentano domini diversi e strutture differenti. L'attività chinasica nei domini intracellulari attiva direttamente signaling, altri invece devono reclutare altre proteine.

Jak-Stat signaling (slide 9 e 10) da parte delle varie citochine di tipo primo. In particolare il G-CSF è associato a Jak1 Stat3. GM-CSF invece corrisponde a Jak2 Stat5.

G-CSF. L'importanza di questa citochina può essere dimostrata anche con singole iniezioni nel topo. (Slide 12) E' necessario comunque avere sempre un riscontro nell'uomo. Iniettando G-CSF in animale è possibile elevare di molto il numero di neutrofili, in maniera dose dipendente (numero di cellule per millilitro per milione).

Un'altra modalità per dimostrare la produzione specifica di quel determinato gene è data dalla delezione specifica in topo Knock Out; tale topo avrà abbassamento numero neutrofili e morirà precocemente.

Neutropenia, ovvero la diminuzione del numero di neutrofili. Sotto 500 è pericoloso, sotto 200 cellule per millimetro cubo di sangue è pericolosissimo; per questo il topo Knock-out muore. La normalità è 3000-7000.

Tabella slide 13 illustra alcuni fenotipi dei topi KO, mancanti delle citochine di tipo 1 e di tipo 2, i loro recettori, jak e stat…

Alcuni fenotipi sono inaspettati e **queste molecole possono avere azione biologica non solo sulle cellule bersaglio principali ma anche su altri tipi cellulari**, come il G-CSF.

(Slide 14) CELLULE CHE RISPONDONO AL G-CSF

Il G-CSF infatti, oltre ad essere fondamentale per aumentare il numero dei neutrofili e nell’agire su cellule mature, può agire anche su un **sottotipo di monociti**, stimolando l’aumento del loro numero e la produzione di citochine proinfiammatorie (in altre situazioni invece può avere azione inibitoria), sui **linfociti T,** stimolandone la differenziazione verso i Th2 o su alcuni sottotipi di **cellule dendritiche**.

(Slide 15) GM-CSF E M-CSF

- **GM-CSF** è un'altra citochina che può agire su vari leucociti, per produrre monociti e granulociti. È importante ricordare il suo ruolo nella maturazione delle cellule dendritiche dai monociti del sangue. I monociti sono l’8-10% dei leucociti. Si isolano i monociti e si cerca di farli maturare in vitro a cellule dendritiche grazie a questo fattore in concomitanza con IL-4 o IL-13. Questo è più semplice che lavorare sulle DC, dal momento che le DC sono poche.

Inoltre GM-CSF può agire sulla sopravvivenza di macrofagi, neutrofili, eosinofili. Influisce sul Priming: potenziamento delle risposte effettrici di queste cellule. Ricordate la funzione di Priming che poi riprenderemo.

Poi può agire anche su cellule alveolari e sulle NKT (che hanno caratteristiche intermedie fra T ed NK)

- L’**M-CSF** invece è una citochina più specifica, agisce a livello del midollo utilizzando i precursori dei monociti che poi daranno origine ai macrofagi. In seguito potrà inoltre agire sui macrofagi maturi favorendo sopravvivenza differenziazione e attivazione.

(Slide 16) **IL-34**

Recentemente è stato scoperto che la citochina IL-34, che da poco è stata clonata, **si lega al recettore per il G-CSF**. Questo recettore è in grado di legare sia IL-34 sia il CSF-1 (o M-CSF).

Si possono usare anticorpi neutralizzanti le citochine o il recettore.

Al momento non si conosce l'eventuale esistenza di un recettore specifico per IL-34.

Quando queste due molecole si legano a questo recettore fanno la stessa cosa.

L'anno scorso però sono stati scoperti **ruoli differenti che caratterizzano IL-34**. IL-34 è infatti prodotto dai cheratinociti e dai neuroni e lega recettori che si trovano in questi tessuti e che favoriscono rispettivamente la maturazione delle cellule di Langherans e anche la maturazione della microglia. Pur legandosi allo stesso recettore queste due molecole sono espresse differenzialmente nei vari tessuti e di conseguenza svolgono funzioni specifiche.

Slide 18:

GM-CSF è più **importante per la maturazione dei macrofagi alveolari** e di **alcuni tipi di cellule dendritiche che si localizzano principalmente nell'intestino**.

M-CSF è importante per la **maturazione di macrofagi che si vanno a localizzare nel peritoneo e nel fegato o per la maturazione di cellule dendritiche del rene, polmone, intestino**.

IL-34 per le **cellule di Langherans dell'epidermide e per la microglia nel cervello**.

È vero che vi è una sorta di ridondanza di azione da parte di queste molecole ma può essere presente anche una certa specificità per quanto riguarda la cellula bersaglio. Tralasciare invece cosa accade nel topo.

<u>**Azione di M-CSF e GM-CSF nel favorire la maturazione dei macrofagi**</u> (slide 19):

Un'ulteriore azione dell'M-CSF e del GM-CSF è illustrata sulla slide 20. Entrambe queste due citochine si possono usare in vitro per favorire la maturazione dei monociti a macrofagi nei vari tessuti (sistema macrofagico tissutale).

In vitro è possibile accelerare questa maturazione trattandoli con M-CSF o GM-CSF; si è visto che **se si usa l'M-CSF** si ottengono dei **macrofagi M2-like**. **Se invece** viene **utilizzato GM-CSF** ottengo **macrofagi M1-like**.

I macrofagi M1 o M2 sono macrofagi tissutali che si possono osservare e che hanno funzioni abbastanza diverse. I macrofagi **M1** sono "**proinfiammatori**" importanti per le difese contro batteri o tumori. I macrofagi **M2** invece sono "**antinfiammatori**" ed hanno per esempio azione protumorale.

È dunque possibile indirizzare i macrofagi in vitro grazie all'utilizzo di queste due citochine (M-CSF e GM-CSF).

AZIONE LOCALE O SISTEMICA:

- Slide 20: **Azione locale**, di lieve entità con risposta infiammatoria con produzione a livello locale di vari mediatori e fattori di crescita che possono agire sulle cellule mature e potenziare le varie funzioni dei tipi cellulari.

- Oppure (slide 21) può esserci **produzione sistemica:** in seguito ad una infiammazione; portano leucocitosi (es 20.000, 200000 in tumore o leucemia), tipica manifestazione infiammatoria.

Slide 22: **Stimolazione dei macrofagi e delle cellule dentritiche da PAMPS e DAMPS:**

PAMPS e DAMPS, ovvero sostanze strane di origine batterica o di origine cellulare, possono stimolare i macrofagi e le cellule dendritiche (infatti sono sicuramente macrofagi e DC le cellule che producono il maggior numero di citochine). Quindi a seconda del tipo di Pamp queste cellule possono produrre IL-1 e TNF che sono le citochine fondamentali per le risposte infiammatorie che poi vanno ad agire sulla cellula bersaglio che quindi produce magari GM-CSF. Oppure i macrofagi o cellule dendritiche possono produrre citochine per la maturazione dei linfociti Th17 che sono specializzati a produrre IL-17. IL-17 può stimolare una cellula bersaglio a produrre G-CSF che è importante per la mobilizzazione dei neutrofili. I Th17 sono i linfociti della risposta immunitaria specifica deputati a risolvere le infezioni da batteri extracellulari e si avvalgono dei neutrofili per "farli fuori". I macrofagi sono le cellule effettrici utilizzate dai Th1 per eliminare i batteri e patogeni intracellulari.

Slide 23: **Potenziali applicazioni cliniche dei CSF**

-

Questi Colony Stimulating Factors (CSF) sono utilizzati in clinica come farmaci abbastanza privi di effetti collaterali. Le possibili applicazioni cliniche sono:

- ridurre effetto della tossicità midollare da chemioterapia antineoplastica e radioterapia. anche cellule sane sono colpite, le cellule più sensibili sono quelle del midollo. Pazienti portatori di tumori si trattano con una serie di farmaci antineoplastici, molecole che bloccano in modo aspecifico la proliferazione di tutte le cellule. Anche le cellule sane sono colpite. Le cellule più sensibili sono quelle del midollo, che proliferano molto. Questi CSF quindi stimolano la produzione dei vari tipi di leucociti.

- favorire attecchimento di midollo osseo trapiantato. Questa è una situazione specifica.

- incrementare i granulociti in corso di anemia aplastica (in cui diminuisce il numero dei leucociti).

- trattare neutropenie congenite e acquisite. Si ha diminuzione del numero dei neutrofili o per cause esogene o per determinate sindromi o malattie genetiche.

- incrementare le funzioni di difesa in pazienti a rischio (pazienti chirurgici, ustionati gravi).

Slide 24: **Potenziali usi terapeutici degli Haematopoietic Growth Factors**

Il professore dice che questa tabella possiamo guardarcela da soli.

Slide 25: **Ruolo di questi fattori di crescita nelle leucemie.**

Nella slide si trova un tabella con i fattori di crescita che favoriscono proliferazione di precursori dei vari tipi leucocitari. Le leucemie che riguardano i vari tipi di leucociti possono insorgere in seguito ad alterazioni di questi sistemi "Citochina-Recettore".

Per esempio **la Leucemia Mieloide Acuta** può essere sostenuta da una stimolazione autocrina da parte di IL-3 o GM-CSF. Sono situazioni in cui si ha una produzione incontrollata di un fattore di crescita che magari può essere prodotto dalla stessa cellula che sta proliferando e quindi si autostimola.

Oppure ci sono delle alterazioni geniche che vanno a colpire i recettori di questi fattori di crescita; possono esserci quindi delle mutazioni che modificano la struttura del recettore per cui questo comincia a funzione anche se non c'è il ligando, quindi funziona sempre e manda il segnale di proliferazione, causa un segnale continuo.

Possono quindi contribuire alla patogenesi, alla proliferazione incontrollata delle cellule tumorali.

Slide 26 e 27: Ci sono farmaci che vanno a neutralizzare il recettore o la molecola

Domanda: Come si differenziano **le cellule dendritiche** che sono già nel sangue?

Risposta: Si tratta di un meccanismo non chiaro: le cellule dendritiche del sangue sono cellule molto plastiche, quindi quando vanno nei tessuti, a seconda dell'ambiente, possono maturare indifferentemente a macrofagi o cellule dendritiche. Una cellula dendritica etichettata proprio come dendritica del sangue, a seconda di dove va e cosa incontra può maturare a cellula dendritica più matura rispetto alla controparte sanguigna ma può anche maturare a macrofago. E viceversa: il granulocita del sangue può maturare a macrofago ma può anche diventare una DC. La storia è un po' complicata. La domanda si può rigirare e chiedersi: le cellule dendritiche dei tessuti da quale precursore a livello del sangue hanno origine? Non si conoscono ancora tutti questi circuiti.

IL-10

Viene introdotta ora IL-10.

Riferimenti alla Table 1 "Stratification of anti-inflammatory pathways", slide 28.

A tutti i livelli (a livello delle barriere anatomiche, delle mucose, nell'interazione PAMP recettore, delle vie di trasduzione, della trascrizione) possono esistere meccanismi che possono controllare negativamente una azione o un segnale proinfiammatorio. Questa complessità di meccanismi è dimostrata dal fatto che conosciamo a vari livelli una serie di geni proteine e molecole che agiscono a questi vari livelli per bloccare risposta infiammatoria. Queste strategie molecolari sono emerse dallo studio su topi Knock Out.

Nell'ambito di queste strategie antinfiammatorie esistono anche meccanismi che riguardano l'espressione di antagonisti recettoriali (decoy receptor) come IL-1RA (receptor antagonist) oppure di recettori solubili per il TNF. Abbiamo inoltre citochine che hanno capacità antinfiammatoria.

La IL-10 è proprio **la regina delle citochine antinfiammatorie**. Si tratta di una citochina immunosoppressiva. Può però avere anche azione attivatoria in determinate situazioni. In realtà è difficile etichettare le varie funzioni, infatti anche il TNF, una citochina proinfiammatoria classica, può avere azione immunosoppressoria (inibendo la funzione dei linfociti T attivati).

In ogni caso, IL-10 è una **citochina dimerica** composta nella sua forma attiva da 2 subunità identiche (vedi immagine slide 29). Essa agisce su un recettore composto da 2 catene: IL-10R1 e IL-10R2. La catena 2 è condivisa con molte citochine, mentre la 1 è molto specifica per l'IL-10. Quando IL-10 lega il recettore, quest'ultimo clusterizza e recluta due chinasi: Jak1 e Tyk2. A loro volta, a seconda del tipo cellulare possono attivare diversi fattori di trascrizione: STAT1, STAT5 e STAT3. Sicuramente l'asse cruciale per l'azione antinfiammatoria è mediato da Jak1 e STAT3. Per STAT1 e STAT5 si conoscono azioni molto più specifiche. Detto ciò non si sa nient'altro al riguardo. Come fa STAT3 a modulare negativamente le azioni di IL-10 non è ancora ben chiaro.

Riferimento al grafico slide 30, con Cascata Citochinica

LPS (azione proinfiammatoria) stimola a mano a mano TNF-alfa, poi IL-1, poi CK e poi IL10. IL-10 prodotta quindi nella fase finale della risposta infiammatoria in seguito agli stessi stimoli proinfiammatori; LPS prepara all'inizio la cellula a rispondere in termini di meccanismi proinfiammatori e in seguito prepara la stessa cellula a spegnersi inducendo una serie di mediatori come IL-10.

Slide 31: IL-10 può essere prodotta da cellule mieloidi. Prodotti microbici posso stimolare le cellule dendritiche, mieloidi, macrofagi a produrre determinate quantità di IL-10. Le cellule plasmocitoidi invece non producono l'IL-10.

-

EFFETTI BIOLOGICI DELL'IL-10, slide 32

IL-10 agisce su tante cellule bersaglio che esprimono il recettore, quindi cellule dendritiche, neutrofili, monociti, linfociti T.

- Spegne la capacità dei monociti e dei macrofagi di presentare l'antigene.

- IL-10 è una delle più potenti molecole capace di spegnere la produzione di citochine proinfiammatorie (e anche chemochine). Se prendiamo una cellula, la stimoliamo con LPS o un qualsiasi stimolo che lega un Toll Like Receptor, IL-10 bloccherà l'induzione per la trascrizione delle varie citochine agendo a livello trascrizionale.

- Inibisce inoltre la produzione dei radicali liberi dell'ossigeno e dell'azoto e in più inibizione della produzione anche dei prostanoidi. Quindi c'è non solo inibizione a livello trascrizionale ma anche a livello enzimatico.

- Aumenta l'espressione del CD64 solo nei macrofagi e monociti (azione mediata da STAT1).

- Induce l'espressione di molecole antinfiammatorie.

- IL-10 potenzia l'espressione dell'antagonista recettoriale per IL-1.

- Inibisce delle risposte infiammatorie di tipo Th1, per esempio bloccando IL-12.

- Ha azione positiva sui linfociti B, azione negativa invece su quasi tutti i leucociti.

EFFETTO DELL'IL-10 **SUI NEUTROFILI**, Slide 33

L'unica azione biologica che esercita sui neutrofili è la capacità di inibire la produzione di citochine e di mediatori proinfiammatori. Non influisce sulla produzione dei radicali di ossigeno, sulla sopravvivenza, sulla fagocitosi ecc.

Spegne a livello sia trascrizione che post-trascrizionale i mediatori infiammatori.

Slide 34. **I neutrofili nel sangue non rispondono a IL-10**; questo perché essi hanno solo una catena recettoriale. In realtà i neutrofili **rispondono** ma **solo quando sono indotti a esprimi l'altra catena recettoriale**, cioè **IL-10R1**. Ci sono quindi delle situazioni che favoriscono l'espressione della catena specifica per IL-10 ed in questo caso i neutrofili rispondono. Quali sono queste situazioni che inducono i neutrofili a esprimere la catena di tipo primo? Tutta una serie di stimoli proinfiammatori.

Per esempio LPS stimola all'inizio i neutrofili a produrre citochine e chemochine; poi più tardi, dopo 3/5 ore, fa sì che i neutrofili esprimano il recettore per IL-10 di tipo primo. Se vengono isolati i neutrofili del sangue, in pazienti settici, vengono ritrovati i recettori perché è presente l'LPS e c'è il recettore alto e possono rispondere a IL-10.

IL-4 è una citochina antinfiammatoria come IL-10 e ha la capacità di spegnere la produzione di mediatori proinfiammatori da parte dei leucociti e sinergizza con IL-10 in questa azione antinfiammatoria o comunque collabora in fenomeni additivi; collabora proprio a livello dell'espressione del recettore per l'IL-10.

Slide 35 e 36: IL-10 **inibisce** l'attivazione di **monociti, macrofagi e cellule dendritiche**. Se è presente IL-10 le funzioni proinfiammatorie di queste cellule sono spente ma allo stesso tempo attiva una serie di fattori antinfiammatori.

Un'altra azione è l'inibizione la **presentazione dell'antigene**, diminuendo la produzione di linfociti T, citochine ecc.

I PATOGENI SFRUTTANO IL RUOLO DELL' IL-10, slide 37

Agenti patogeni cercano di sfruttare il ruolo di IL-10 come meccanismo di evasione immunitaria, e ciò peraltro dimostra l'importanza di questa citochina. Certi virus all'interno del loro genoma codificano delle proteine che hanno una forte analogia con IL-10. I seguenti patogeni codificano una loro IL-10: EBV, CMV, HERPESVIRUS e altri.

Oppure altri virus agiscono sul recettore di IL-10 e inducono immunossoppressione.

Altri ancora inducono direttamente IL-10: EBV, HIV, CMV, virus respiratorio sinciziale, e anche i micobatteri.

Slide 38**:**

IL10 è un fattore fondamentale che riguarda il mondo dei T-cell-regulatory, Treg.

Non solo IL-10 è importante nel fattore di maturazione dei Treg ma rappresenta anche una delle citochine prodotta dai T Reg. Previene fenomeni autoimmunitari ed allergici ed è coinvolta nel fenomeno della tolleranza.

Slide 39 sui sottotipi di T helper cells (le CD4).

Slide 40 e 41. Oggi si sta scoprendo che nelle varie fasi maturative dei cloni T helper (Th), Th2 e Th17 possono produrre IL-10. Si trovano dei doppi positivi dei vari sottotipi dei linfociti T helper.

Da una parte quindi IL-10 inibisce le cellule mieloidi, dall'altra parte attiva i linfociti per proliferazione, differenziazione e produzione di anticorpi.

IL-10 funziona tramite STAT3. Slide 42 mostra le azione di STAT3, anche se non si sa come si arrivi da STAT3 a tutte queste risposte.

Segue spiegazione dello schema della slide 43 sulla **regolazione negativa della produzione di IL-1-beta.**

All'inizio un PAMP che lega un Toll Like Receptor che poi è in grado di attivare la trascrizione dell'IL-1-beta: effetto positivo a livello della trascrizione; si forma l'mRNA dell'IL-1-beta. A questo livello possono esistere dei meccanismi di controllo sia dell'emivita che della traduzione. Se procede tutto bene si forma la Pro IL-1-beta che ha bisogno di essere processata dall'inflammosoma per essere poi liberata in forma attiva e essere in grado di legare il recettore specifico. Questa quindi è la linea positiva.

Dallo stesso segnale che è in grado di iniziare questa via positiva della produzione di IL-1-beta possono contemporaneamente partire i segnali negativi. Uno di questi riguarda la capacità di questo segnale di indurre la trascrizione di IL-10, che quindi viene tradotta, e può agire su una cellula vicina, a livello del recettore specifico, attivando STAT-3. STAT 3 allora può interagire con queste molecole di cui abbiamo parlato (le chinasi); Stat 3 può modulare negativamente a livello post-trascrizionale sia la stabilità del messaggero per IL-1-beta, sia la traduzione (favorita la degradazione dell'mRNA messaggero). Quindi può agire a livello post-trascrizionale e post-traduzionale per bloccare la sintesi di IL-1-beta, oppure STAT3 può indurre la produzione di IL-1RA (receptor antagonist). Questo IL-1RA va a legarsi al recettore e impedisce a IL-1-beta di legarsi e inattivare il recettore.

Lo stesso stimolo può avere un effetto positivo o anche, attraverso IL-10, agire a vari livelli della cascata per bloccare la produzione di IL-1-beta.

IL-TEENAGERS ovvero la **FAMIGLIA DI IL-10**.

Slide 44. Successivamente a IL-10 sono state clonate altre molecole, altre interleuchine (22, 26, 19, 20, 24) e si parla di "famiglia di IL-10", IL-TEENAGERS. Queste sono tutte molecole che hanno un collegamento con IL-10. Alcune di queste sono localizzate sullo stesso cromosoma sia nel topo che nell'uomo, e poi agiscono su sistemi recettoriali che condividono alcune catene. In modo particolare la catena dei CR2 è condivisa dal recettore per la 10 per la 19 per la 26 e 22; la situazione è apparentemente ingarbugliata ma in realtà il collegamento tra i loro ruoli c'è.

Slide 45 e 46. Segnali di trasduzione attivati da queste citochine sono infatti molto simili.

Slide 47. Gli **effetti biologici** di queste citochine collegate con IL-10 sono svariati. A differenza di IL-10 molte di queste citochine non hanno azione antinfiammatoria se non in determinate situazioni (azione pro o antinfiammatoria a seconda dello stimolo e patologia).

Slide 51, 52 e 53. Per esempio IL-22 prodotta dai Th17, è molto importante per il contributo alla difesa dalle infezioni batteriche extracellulari perché innesca a livello delle mucose, dell'intestino e

a livello polmonare una serie di meccanismi per l'attivazione di peptidi antimicrobici che bloccano le infezioni.

IL-24 invece è una citochina ad azione antitumorale, molto studiata ora per i tumori e come potenziale farmaco.

GLI INTERFERONI

[*solo accennati in questa lezione, quasi tutte le cose dette qui sono poi state riprese nella lezione seguente; le slide di riferimento si trovano infatti nella lezione del giorno seguente, ndr*]

La famiglia dell'IL-10 è collegata alla famiglia degli Interferoni.

Slide 1. Oggi conosciamo **3 classi: Tipo primo, Tipo secondo e Tipo terzo.**

1. Il primo include l'interferone Alfa e l'interferone Beta.

1. Il tipo 2 è rappresentato solamente dall'interferone Gamma.

1. Il tipo 3 comprende gli interferoni Lambda.

Poi ci sono anche altri interferoni.

Spesso si trovano nei lavori vecchi le nomenclature “fibroblastico”, "leucocitario" o "immune".

- Fibroblastico è Interferone Beta.

- Leucocitario è invece l’alfa, ma in realtà tutte le cellule possono produrlo, perché tutte le cellule possono essere infettate dai virus.

- L’immune è l’Interferone gamma, importante per la modulazione del sistema immunitario e prodotto selettivamente solo da alcune cellule, a differenza degli altri interferoni.

I lambda sono i "nuovi" interferoni, associabili a IL-29, IL-28A, IL-28B.

L'interferone di tipo 1 comprende oltre ai già citati Alfa e Beta, anche Epsilon Kappa Omega. Il tipo 2 solamente Gamma. Il tipo 3 lambda1--IL29, lambda2--IL28A, lambda3--IL28B.

Nelle tabelle si possono anche notare le sorgenti primarie di questi interferoni.

Lezione di Patologia generale e fisiopatologia clinica (sem2) del 26/3/2013 (1)

Prof. Cassatella

Sbobinatore: Fraccaro Marta

Revisore: Rossati Claudia

Riprendendo un attimo il discorso di ieri sugli interferoni vi ricordo:

IFN tipo I: IFN α, β e altri

IFN tipo II: IFN γ

IFN tipo III: IFN λ

SLIDE con tabella: The human interferons

Come vediamo qui scritto esistono 14 tipi diversi di interferone α che legano tutti lo stesso recettore e non si capisce se hanno funzioni differenti. Esistono comunque vari reagenti per studiarli.

Esiste invece un unico gene che codifica per l'interferone β. Gli interferoni di tipo I non hanno, a livello genico, introni.

Altri interferoni del tipo I sono ε, κ, ω.

Qua vedete le sorgenti principali, ovvero non sono le uniche come già detto ieri (vedi tabella).

NB: l'interferone di tipo κ è prodotto esclusivamente dalle cellule NK e dai linfociti CD4+ e CD8+.

Poi ci sono i tipo III, che sono IFN λ1, 2, 3. Poi il mese scorso è stato scoperto anche il λ4, per cui mi raccomando ora sono 4 in realtà.

Questi corrispondono ad alcune molecole che inizialmente sono state chiamate IL29, IL28A e IL28B; poi son stati fatti degli studi di comparazione e omologia si è capito che queste molecole costituivano dei nuovi tipi di interferone.

SLIDE tratta da P.M. George et al.

Qua vedete un altro schema con i tipi di interferoni e i complessi recettoriali che i vari tipi di interferoni legano.

Quindi vedete che quelli di tipo I legano tutti lo stesso complesso recettoriale, composto da 2 catene (IFNAR1 e IFNAR2) che a sua volta recluta queste due tirosinchinasi JAK1 e TYK2 che sono importanti trasduttori del segnale per gli interferoni di tipo I.

Alla fine questi 2 membri della famiglia JAK fosforilano un complesso trascrizionale chiamato ISGF3 che è un complesso multimerico formato da IRF9, STAT1 e STAT2 (Interferon Responsive Factor 9).

Una via di traduzione molto importante attivata da interferone di tipo I è dunque costituita da questo complesso ISGF3 che lega nel nucleo una serie di sequenze bersaglio dette ISRE (Interferon Sensitive Responsive Element).

Ancora, come vedete da questa figura la via degli interferoni λ di tipo III è molto simile: in questo caso il gruppo di citochine lega il proprio recettore, che è diverso da quello del tipo I, e che è composto da IL10R2 dove vedete come la stessa catena del recettore funziona da catena accessoria del recettore effettivo che è costituito da IFNLR1 (Interferon Lambda Receptor 1) nota anche come IL28RA.

Questo complesso recluta ancora una volta JAK1 e TYK2 che poi vanno a fosforilare il complesso ISGF3.

Ci sono studi di microarray in cui vengono identificati in un colpo solo geni regolati attraverso una micropiattaforma e una serie di tecnologie sofisticate, ormai alla portata di quasi tutti, che dimostrano come i geni indotti da interferoni di tipo I e tipo III sono molto simili. Ci sono pochissime differenze e caso mai queste consistono nelle cinetiche e negli aumenti relativi. Per il momento si sa che la riposta mediata da questi recettori è molto simile.

Per quanto riguarda l'interferone λ4 invece, che è stato scoperto un mese fa, per ora si sa che è una citochina che non viene secreta, che funziona quindi dentro la cellula (intracellulare) per cellule epiteliali.

Vedete poi che l'interferone di tipo II attiva JAK1 e il fattore di trascrizione fondamentale per l'interferone γ è rappresentato da STAT1 che lega le sequenze GAS (Gamma Activated Sequence).

IFN tipo I

Slide " Virus-infected host cells"

Gli interferoni di tipo I sono le citochine fondamentali per le riposte innate contro i virus, assieme all'azione delle NK attivate da IFN alpha.

Vediamo dallo schemino che quando abbiamo una cellula infettata da virus questa comincia a produrre IFNα e β (e dovremmo anche aggiungere tipo λ, a seconda del tipo di recettore presente nella cell.).

L'IFN di tipo I, prodotto in risposta all'infezione da virus, ha un'azione prevalentemente paracrina ovvero è in grado di proteggere le cellule vicine a quelle infettate, nel senso che se queste cellule sottoposte all'azione dell'IFN vengono infettate, sono in grado di impedire la replicazione del virus (ricordate che l'obiettivo del virus è replicarsi e basta, tutto ciò che avviene dopo sono danni collaterali, inoltre i virus sono capaci di antigenicità nel temp e possono sopprimere la risposta immune).

L'IFN innesca anche una serie di risposte sempre volte a mediare funzioni antivirali tra cui ad es.:

- aumenta l'espressione di antigeni di classe I (MHCI), importante per favorire l'azione dei linfociti CD8+ essenziali per debellare l'infezione virale
- attiva le cellule NK, cellule dell'immunità innata che hanno diverse funzioni tra cui quella di essere in grado di uccidere le cellule infettate da virus

Slide in inglese

Questa è un'altra versione classica di come avviene la produzione degli interferoni: qui abbiamo la cellula che viene infettata da virus e quindi prodotti virali, o proteici o acidi nucleici, agendo attraverso i vari Toll-like Receptors, fattori citoplasmatici ovvero sensori per i recettori virali attivano fattori di trascrizione per IFN tipo I, α e β, che viene rilasciato e va alle cellule vicine, dove vedete il recettore specifico. Attiva quindi ISGF3 e non solo che a sua volta attiva la trascrizione di tutta una seria di geni ISG (Interferon Sensitive Genes) che in tutto son ca 100, con diverse funzioni (antinfiammorie, apoptotiche, ecc.).

Slide con Tabella: Induttori dell'IFN tipo I: il prof legge pari pari la slide

Slide Immunità contro i virus

L'immunità contro i virus può essere innata/naturale e specifica:

Immunità naturale:

- produzione di IFN (da parte delle cellule infettate da virus)
- cellule NK (agiscono precocemente, sono attivate da IFN α, uccidono cellule infettate da virus)

Immunità specifica:

- anticorpi specifici: molecole ad azione neutralizzante che vanno a legarsi a componenti virali impedendo il legame del virus alla cellula bersaglio (sono alla base della vaccinazione profilattica: si fanno produrre anticorpi specifici contro antigeni virali in modo tale che se il soggetto vaccinato viene a contatto con quello specifico virus gli anticorpi già presenti ne impediscono il legame alla cellula)
- linfociti T citotossici (CD8+) che sono rivolti verso cellule già infettate e sono i veri protagonisti della risoluzione delle infezioni virali e che rilasciano una serie di citochine e composti tossici ed enzimi che vanno a distruggere le cellule infettate.

I virus sono capaci di:

- grande antigenicità nel tempo, ovvero son capaci di cambiare antigeni (è questo il caso per es. dell'HIV che cambia continuamente faccia per cui il sistema immunitario si trova a lottare contro sempre nuovi antigeni)
- sopprimere, evadere la risposta immunitaria attraverso una serie di meccanismi

L'infezione virale/la risposta immune può causare danno per:

- formazione di immunocomplessi circolanti
- fenomeni autoimmunitari

Slide con Innate e Adaptive

Qui vedete un'altra figura che illustra i meccanismi dell'immunità innata e specifica già illustrati nella diapositiva precedente (*il prof legge pari pari la figura – NdR)*

Slide Fig. 14-12

Qui vedete la cinetica che rappresenta i momenti in cui questi fenomeni si montano (vedi figura).

Quindi all'inizio abbiamo Interferone e NK che intervengono quasi contemporaneamente poi nel frattempo si attiva la risposta umorale (un po' ritardata rispetto all'immunità innata) e infine lo sviluppo dei linfociti T citotossici, che richiede un po' di giorni e che debellano definitivamente la proliferazione dei virus.

Slide con Tabella: Meccanismi dell'immunità umorale e cellulo-mediata in risposta ai virus

Vedete qui una serie di ruoli che hanno gli anticorpi e le varie sottoclassi di anticorpi: IgA, IgM e IgG. Per esempio vedete come IgG e IgM possono non solo neutralizzare l'infezione virale, ma anche facilitare la fagocitosi attraverso l'opsonizzazione.

Poi vedete meccanismi cellulo-mediati: vedete l'IFN γ che è una citochina importante prodotta da linfociti Thelper TH1e CTLs, NK e Mφ.

Questa citochina media infatti le risposte TH1 ovvero le risposte indotte per debellare i patogeni intracellulari.

Slide successiva

Qui vediamo un'altra versione.

Il dogma era che per quanto le infezioni virali, la produzione di IFN tipo I era ad opera delle cellule plasmacitoidi (pDCs). Queste sono un sottogruppo delle Cellule Dendritiche (DC) e si trovano nel sangue, ma anche nei tessuti e nei linfonodi. Le cellule plasmacitoidi rispetto alle altre cellule in generale e alle altre DC sono in grado di produrre una quantità enorme di IFN α (sono delle vere e proprie fattorie di IFN α).

Si riteneva per questo che fossero le cellule chiave, e di fatto queste sono importanti percheé intervengono per prime, ma successivamente anche altri tipi cellulari possono contribuire alla quantità totale di IFN tipo I quali ad esempio altre DC, Mφ, Linfociti B e cellule stromali.

Slide: Human Blood Dendritic Cells (Dcs)

Le varie cellule dendritiche sono:

- le Conventional DC, che si suddividono in vari sottotipi di cui le CD1C+ sono le più studiate e sono le cellule dendritiche classiche
- Slan DC, che sono capaci di produrre grandissime quantità di TNFα e IL12, quindi sono cellule proinfiammatorie che infiltrano i vari tipi di tessuto in alcune malattie infiammatorie croniche quali ad es. artrite reumatoide, morbo di Chron, psoriasi ecc.
- CD141+ (o meglio BDCA3)
- le Plasmacitoidi (pDCs, che sono le BDCA2)

Il diverso modo di nominarle le DC utilizza gli antigeni espressi dalle cellule che sono appunto i diversi BDC.

Bisogna fare attenzione qua perché nella tabella degli interferoni c'era scritto che le maggiori produttrici di IFN λ sono le plasmacitoidi, in realtà non è così: si è scoperto infatti che i maggiori produttori di fatto sono le CD141+.

Quindi le cellule specializzate per la produzione di IFN α sono le plasmacitoidi per l'IFN λ sono le CD141+. Tutto questo ha avuto un'implicazione notevole per lo studio dell'epatite C.

Slide Fig. 4-16 Biologic actions of type Interferons

Come fa l'IFN tipo I a proteggere una cellula che non è ancora stata infettata dalla replicazione virale?

I meccanismi sono noti e vi vedete il solito schemino della cellula infettata.

L'IFN è di fatto in grado di attivare una serie di risposte che sono:

- aumento e attivazione della PKR (proteina chinasi R)
- attivazione dell'enzima 2-5-oligo-A-sintetasi
- attivazione del gene specifico Mx GTPasi

Per farla breve l'IFN induce una serie di effetti che determinano la inibizione della sintesi proteica degli RNA messaggeri virali *(nelle cellule non infettate),* portando ad es. alla loro degradazione o all'inibizione del macchinario della traduzione virale.

Slide Fig. 6-3 Translation inhibitory pathways

Qua avete un altro schemino che vi spiega appunto come alla fine quello che fa l'IFN è inibire la traduzione dei messaggeri virali.

I virus si difendono attaccando le cascate di trasduzione cellulare che portano appunto a questa inibizione, degradando per esempio i fattori di fosforilazione.

Riassumendo i meccanismi con cui l'IFN blocca i virus sono:

DIRETTI:

- degradazione mRNA virale
- inibizione macchinario traduzione virale

INDIRETTI (ovvero che favoriscono le risposte dell'immunità innata e specifica):

- potenziamento delle NK nella loro attività citotossica (legandosi ad esse)
- aumento dell'espressione degli antigeni di istocompatibilità di classe I (MHC I), espressi in tutte cellule che presentano gli antigeni ai linfociti T citotossici (APCs)

Slide Inhibition of class I MHC- associated antigen presentation by viruses

I virus ovviamente cercano di interferire in questo processo dell'aumentata espressione degli MHC I andando a interferire con le tappe metaboliche intracellulari fondamentali per la presentazione dell'antigene (vedi figura). Possono anche inibire i proteasomi.

Slide con Tabella: Meccanismi di evasione immunitaria: vedere bene tabella

Il prof legge pari pari e velocemente la tabella con gli esempi (NdR)

Slide TAB 23.2: Therapeutic indications for type I IFNs (vedere bene tabella)

Vediamo quindi che gli interferoni di tipo I sono utilizzati in terapia contro alcune infezioni virali.

Ad es. l'IFN α, ma anche β, vengono utilizzati per alcune patologie come sclerosi multipla (β in particolare) e epatite.

Slide Table 3: A synopsis of the principal biological activities of IFNα/β

Gli IFN tipo I quindi oltre ad avere questa importante azione antivirale possono anche indurre altre biologiche:

- modulazione dell'espressione di MHC I o II
- stimolazione cellule NK
- azione inibitoria sulla proliferazione delle cellule (di cui vi accennavo ieri)
- azione immuno-soppressoria (ecco ad es. perché utilizzato nella Sclerosi Multipla)
- attività antitumorale: bloccando la proliferazione, ma anche con altri meccanismi solo in parte conosciuti

Ad es. uno dei meccanismi antitumorali è la stimolazione da parte di IFN di tipo I di cellule NK, di linfociti T, ma anche di macrofagi.

Un altro meccanismo antitumorale, che è stato anche dimostrato nel lenire la sclerosi multipla, è la capacità degli IFN di tipo I di aumentare l'espressione di TRAIL (vedi figura slide FIG. 3).

Questa è una citochina con una forte proprietà citotossica di cui avevo accennato quando avevo parlato della famiglia dei TNF.

TRAIL è una molecola che è in grado di indurre l'apoptosi nelle cellule bersaglio, ma solo nelle cellule che esprimono uno dei 2 recettori (TR1 o TR2) che a livello del dominio intracellulare contengono il Death Domain e guarda caso la gran parte delle cellule tumorali esprime questo recettore quindi rispondono a TRAIL che ne induce l'apoptosi.

Gli altri recettori -che vedete- sono espressi nelle cellule normali, sane. Sono ad es. o recettori solubili che funzionano come decoy oppure altri recettori legati alla superficie che per vari motivi non mandano segnali né hanno questo Death Domain.

Quindi TRAIL è una delle molecole indotte da IFN tipo I che può spiegare alcune delle azioni, in certi casi positive in certi negative, mediate da IFN I.

(TRAIL è anche una molecola molto studiata anche in oncologia come terapia antitumorale, per es. vengono usati farmaci che ne mimano l'azione per colpire le cellule tumorali)

Slide: Selected reports describing immune correlates of clinical response to IFN α

Gli IFN tipo I, in particolare IFN α viene usato in combinazione con altri farmaci per curare certi tipi di tumore quali ad es. melanomi.

Nota bene: per la leucemia mieloide cronica IFN non vengono più usati dopo che si son scoperti e prodotti gli inibitori di TCR/ABL (? *non son sicura di questa sigla*) di cui parleremo, per cui ora si usano farmaci molto più specifici.

Segue lettura slide

Slide con Fig. 4: Type I IFNs in human diseases

IFN tipo I è dunque una citochina che può avere effetti positivi in certe situazioni, ma è anche una citochina patogenetica in altre malattie soprattutto nel Lupus e in alcune forme di psoriasi.

Ha effetti positivi come vedete nella sclerosi multipla e in alcune malattie neoplastiche tramite TRAIL.

Segue una domanda sui recettori di TRAIL, che son chiamati TR1 e TR2 (Trail Receptor 1 e 2) VEDI BENE SIGLE TN dl?4 e 5?

IFN λ (slide)

Ora due parole sugli interferoni λ che sono indotti anche questi come gli IFN di tipo I da parte di virus che infettano la cellula bersaglio. Qua si vede l'attivazione di vie di trasduzione che alla fine convergono su vari fattori trascrizionali IRFkB e vari componenti della famiglia, IRF3 e IRF7 andando ad attivare la trascrizione rispettivamente degli IFN β e α e anche λ (IL29, IL28A, IL28B).

La slide sembra molto complicata, ma in realtà è molto semplice perché è uno dei soliti schemi che mostra l'attivazione degli interferoni.

Il prof legge le vie di attivazione degli IFN α, β pari pari alla slide.

Queste stesse vie portano attivano anche la trascrizione dei vari tipi di IFN λ (IFN tipo III).

Quindi gli IFN λ:

1. sono prodotti dalle cellule infettate da virus tanto quanto gli IFN di tipo I,

2. legano un complesso recettoriale che attiva una via di trasduzione che porta all'attivazione di fattori di trascrizione condivisi con la via di trasduzione degli IFN di tipo I e quindi fanno in sintesi cose molto simili.

E' quindi chiaro che anche gli IFN λ possono avere azione antivirale, come dimostrato da vari studi elencati in questa diapositiva molto complicata. (Vedi slide Table 2, Table 3, Table 4)

Ci sono però delle differenze tra IFN tipo I e IFN tipo III (λ) che rendono particolarmente interessante l'uso di questi interferoni soprattutto nell'epatite C.

Vedete nel disegno (*Slide con uomo colorato in rosso e nero*) che sono indicati i tessuti bersaglio degli IFN III.

A differenza di quelli di tipo I che possono agire su tutte le cellule, vedete che solo le cellule epiteliali rispondono agli IFN tipo III, questo perché per ora, per quello che si sa, solo queste cellule esprimono i recettori per gli IFN λ. I leucociti sembrano non esprimerli, forse li esprimono le cellule plasmacitoidi, sempre da studi in vitro.

Quindi come abbiamo visto le DC di tipo CD141+ quando sono stimolate da alcuni prodotti virali possono produrre IFN λ e questo può agire o sulle cellule epiteliali (ad es. sulle cellule epatiche che sono epiteliali) o su cellule plasmacitoidi che a loro volta stimolano la produzione di IFN λ stesso. Diversi studi stanno cercando di capire questo circuito che si innesca nell'epatite C nella quale si pensa sia coinvolto l'IFN λ nella patogenesi come poi nella guarigione da questa malattia.

C'è quindi un network tra cellule epatiche infettate e leucociti infiammati che possono produrre e rispondere a IFN λ.

Quindi negli ultimi anni si è cominciato ad usare l'IFN λ nel trattamento dell'epatite C. Questa è una malattia molto aggressiva che può portare una certa % di pazienti affetti o alla morte o allo sviluppo di tumori al fegato. Il motivo per cui si sta cercando di usare l'IFN λ è proprio legato all'azione specifica sulle cellule epiteliali di questa citochina (a differenza dell'IFN α che oltre ad agire sulle cellule epiteliali agisce su altre cellule e può quindi produrre e di fatto produce effetti collaterali). Quindi di fatto l'IFN λ è meno tossico, ora ci sono dei trials per capire se funziona.

Slide: Key Points 3

Un'altra cosa interessante, dopo la scoperta degli IFN, è che si è visto che ci sono pazienti che rispondono alla terapia con IFN α e pazienti che non rispondono o rispondono molto poco, e si è visto che i pazienti che rispondono sono soggetti che hanno dei polimorfismi a livello del locus dell'IFN λ3.

Si sta quindi cercando di capire qual è collegamento tra questi polimorfismi e la risposta all'IFN α, dato che di fatto non vanno a incidere nell'espressione o nel funzionamento dell'IFN α.

Quindi non si sa ancora nulla del meccanismo, ma questo comunque permette di predire quali pazienti risponderanno alla terapia con IFN α e quali no.

Slide Fig. 25.2

Proprio cercando di studiare i meccanismi con cui questi polimorfismi influenzino la terapia con IFN α, è stato scoperto l'IFN λ4. E' stato individuato un quinto polimorfismo, questa volta all'interno del locus, la cui mutazione determina la sintesi di questa nuova proteina. Adesso quindi si sta cercando di capire che ruolo ha e che funzione ha questo λ4 nell'ambito della patogenesi dell'epatite C o nell'influenza della risposta terapeutica con IFN α.

IFN γ

Passiamo ora all'interferone γ.

E' un IFN di tipo II ed è prodotto esclusivamente dalle cellule NK e dai linfociti T CD4+ (TH1) e soprattutto CD8+ (citotossici).

Queste sono le cellule sicuramente capaci di produrre notevoli quantità di IFN γ. Poi c'è in letteratura una serie di osservazioni che suggeriscono che anche altre cellule possano produrre IFN γ, ma se anche ci sono queste lo producono in quantità microscopiche.

L'IFN γ è una citochina che ha anch'essa un'azione antivirale diretta come gli IFN I, ma rispetto a questi ultimi ha un'azione antivirale (dimostrata su studi in vitro) di 100-1000 volte inferiore: quindi per questo motivo non è considerata come un inibitore diretto della replicazione virale.

E' però una citochina fondamentale per le risposte antivirali in quanto attiva le risposte indotte da linfociti Th1 (inibitore indiretto).

Come potete vedere dalla figura (vedi slide) qui abbiamo le cellule bersaglio dell'IFN γ che agisce praticamente su tutti i tipi di leucociti. Quindi vedete che:

- agisce sui neutrofili attivandoli,
- agisce sui macrofagi in questo caso potenziando le loro azioni effettrici e non stimolandoli direttamente,
- ha bassa attività antivirale
- inibisce l'ematopoiesi, agendo su varie cellule del midollo
- può attivare i linfociti T
- può anche agire sui linfociti B
- induce l'espressione non solo gli antigeni di classe I, ma soprattutto quelli di classe II (meccanismo chiave e peculiare dell'IFN γ)
- potenzia le cellule NK
- attiva le cellule endoteliali.

Quindi in sostanza agisce sulle cellule per favorire l'imunità cellulo mediata che è quella responsabile dell'elimazione dei patogeni intracellulari.

Slide con Fig. 15-3 Innate and adaptive immunity to intracellular bacteria

Qua vedete come sempre l'immunità innata e seguita poi da quella specifica contro i batteri intracellulari.

In entrambi i casi l'IFN γ è molto importante:

<u>nell'immunità innata:</u>

IFN γ è prodotto dalle cellule NK che una volta stimolate a produrlo indirettamente agiscono sulle altre cellule effettrici dell'immunità innata, i macrofagi, potenziandone l'attività.

Questi poi a loro volta producono IL12 in risposta ad agenti patogeni.

IL12 stimola a sua volta NK a produrre IFN γ e quindi abbiamo questo circuito a feedback che si auto alimenta;

<u>nell'immunità specifica</u>:

IFN γ è prodotto dai linfociti T CD4+ che una volta attivati dalle APC maturano e producono questa citochina, orchestrando quindi poi la risposta cellulo-mediata.

(Qua il prof dice che va veloce, perché son cose che ha già detto, e passa via veloce un paio di slide che ci riguardiamo noi con calma - NdR)

Nel caso poi della produzione di IFN γ da parte di cellule dell'immunità innata come specifica, l'IFN γ può andare a potenziare l'espressione degli antigeni di istocompatibilità di classe II (MHC II) e quindi si ha un aumento della capacità di presentare gli antigeni e un aumento della risposta mediata da linfociti T.

La funzione di aumentare sia l'espressione di MHC I e soprattutto di MHC II sinergizza poi con l'azione dei TNF.

Azione fondamentale per la risposta Th1 nell'infiammazione cronica (come vedremo più avanti) è la capacità dell'IFN γ di attivare i macrofagi, ovvero cambiare il programma genetico aumentando le funzioni effettrici di queste cellule con potenziamento dell'attività microbicida.

L'IFN γ può agire anche sui linfociti B favorendo in sintesi la produzione di quegli anticorpi che hanno azione opsonizzante e quindi favorisce indirettamente la fagocitosi dei patogeni.

Slide Fig: 10-7 Macrophagi activation by Th1 cells

il prof dice che salta questa slide sui macrofagi e ripete quanto detto prima

L'IFN aumenta nel frattempo la produzione di NADPH ossidasi e comunque degli enzimi dei macrofagi, ad esempio aumenta la produzione di nitrossido sintetasi che normalmente i macrofagi hanno a bassissimo livello.

Quindi in sintesi l'IFN γ opera una serie di effetti che portano il macrofago da una parte a fagocitare con maggiore efficacia e dall'altra a produrre una maggiore quantità di composti tossici (ROS, NO).

Altra cosa l'IFN γ aumenta nei macrofagi la capacità di produrre citochine infiammatorie (TNF) e infine aumenta l'espressione di tutte le molecole richieste per attivare i linfociti T.

Slide: Macrophage – Lymphocyte interactions in chronic inflammation

L'infiammazione cronica si caratterizza, come vedremo, dalla presenza e dal reclutamento di nuovi tipi cellulari diversi rispetto a quelli reclutati nell'infiammazione acuta.

L'infiammazione cronica si monta in quanto persiste la causa di infiammazione persiste e non è stata eliminata dall'infiammazione acuta (e quindi arrivano nuovi componenti cellulari). Nel frattempo si monta la risposta specifica e quindi linfociti T che attivano i macrofagi.

Qua vedete il linfocita T indotto a produrre IFN γ e altri mediatori che va ad attivare il macrofago.

Questo cambia "faccia", cambia dimensioni e funzioni e comincia a produrre mediatori in grande quantità tra cui IL 12 che va a stimolare di nuovo i linfociti T a produrre IFN γ.

Quindi abbiamo di nuovo questo circuito a feedback che si autoalimenta, come quello che avevamo visto prima con le cellule NK.

Slide Fig. 11-14 Ig heavy chain isotype

Qua abbiamo l'IFN γ che agisce sui linfociti B, facendo cambiare il tipo di immunoglobuline prodotte da queste cellule.

Da una parte inibisce la sintesi delle di IgE (magari indotta da IL 4) e dall'altra attiva i linfociti B ad aumentare l'espressione di certe sottoclassi delle IgG (IgG1 e IgG3) che hanno capacità opsonizzante molto marcata. Queste poi si legano a ??? non sento bene cosa dice.

Slide successiva

Come già detto l'IFN γ si lega al suo complesso recettoriale e quindi attiva le STAT 1, ma non solo, e queste agiscono sulle sequenze GAS (vedi sopra).

Poi ci sono però anche altri fattori di trascrizione come ad esempio IRF1 e IRF9 che sono sempre attivati da IFN γ. E quindi si hanno vere e proprie ondate di geni IFN γ-dipendenti regolati appunto da fattori di trascrizione attivati da IFN γ stesso quindi di tipo II, come anche ugualmente si hanno per l'IFN di tipo I.

Slide Table 24.2: Phenotypes of mice lacking components of the IFN γ signalling pathways

A dimostrazione dell'importanza di questi componenti della via di trasduzione del segnale nel mediare l'azione di IFN γ ci sono studi su topi *knock out* ovvero su topi specificamente che non esprimono questi geni.

Ad esempio STAT1 è importantissimo per mediare l'azione dell'IFN γ: topi KO per STAT1 presentano infatti una aumentata suscettibilità a infezioni virali e batteriche.

Oppure ad esempio SOCS-1 (una delle proteine intracellulari in grado di inibire segnali attivati da citochine) è fondamentale nello spegnere la risposta all'IFN γ. Il topo KO per SOCS-1 presenta una serie di anomalie infiammatorie di varia natura, ma comunque esaltate che di norma sono indotte da IGN γ. Quindi senza il blocco tutte le riposte indotte da IFN γ sono aumentate e incontrollate.

(Ovviamente la via JAK-STAT non è l'unica, vi vedete qua le altre vie).

Slide Table 2.1: Biological Activities of IFN

Qua illustrate vediamo le attività biologiche dei vari interferoni e vediamo quali sono comuni e quali attivate selettivamente dall'IFN γ.

Segue lettura veloce di alcune parti della tabella, il prof dice di guardarle noi con calma.

Ricordate che anche IFN γ può avere azione antitumorale.

Segue altra lettura veloce dell'elenco presente nella slide sull'azione antitumorale dell'IFN γ.

Slide Fig. 2 Therapeutic Indications

(Il prof dice che questa è aggiornatissima quindi di guardarla bene)

Questa diapo illustra alcune indicazioni terapeutiche per l'uso degli interferoni.

L'IFN γ in particolare viene usato in certi pazienti con CGD, Malattia Granulomatosa cronica, proprio perché ha la capacità di aumentare la sintesi dei componenti della NADPH ossidasi, quindi pazienti che hanno deficit di produzione di questa proteina possono rispondere alla terapia con IFN γ sia perché questo ne fa aumentare la sintesi sia perché soprattutto va a stimolare il sistema immunitario.

IL 12

L'interleuchina 12 è diciamo l'altra faccia dell'IFN γ.

E' una citochina chiave sia per l'immunità innata che specifica.

E' composta da 2 catene, la p35 e la p40, che funziona ed ha attività biologica solo ed esclusivamente in forma eterodimerica. Le 2 catene quindi possono essere prodotte indipendentemente, singolarmente, ma solo quando sono eterodimerizzate l'IL12 svolge la sua attività biologica classica.

Qua la figura vi fa vedere le principali cellule capaci di produrre IL12.

Sono soprattutto le cellule dendritiche che hanno la maggior capacità di produzione di questa citochina in termini di quantità assoluta, ma ci sono anche i leucociti, i macrofagi e i linfociti B (è stata scoperta proprio studiando questi linfociti).

Vediamo alcuni tipi di stimoli che possono indurre la produzione di IL12:

- tutta una serie di PAMP
- CD40L (CD40 ligando)
- RANKL (Rank ligando)
- IFN γ
- IL4
- altri segnali non provenienti dalla matrice extracellulare

E'stata la prima IL ad essere scoperta in forma eterodimerica, lega un recettore quindi composto da 2 catene, β1 e β2 che attraverso una via TYK2 e JAK2 attiva STAT4 che è il fattore di trascrizione essenziale per l'IL12.

Topi KO per STAT4 hanno una risposta deficitaria all'IL12 e presentano uno sviluppano dei linfociti Th1 difettoso.

Slide Cytochines of innate and adaptive immunity

IL12 viene classificata come una citochina che fa da ponte tra immunità innata e specifica.

E' infatti una citochina che è prodotta da cellule dell'immunità innata (cellule dendritiche, neutrofili, macrofagi), induce la produzione di IFN γ, ma soprattutto che agendo sui linfociti T naive è in grado di attivare (sempre con produzione di IFN γ) la risposta di tipo Th 1, che è fondamentale per l'eliminazione dei patogeni intracellulari.

Slide Funzioni biologiche principali dell'interleuchina IL12

Funzioni biologiche di IL12:

- induce la differenziazione delle cellule T naive verso Th1
- induce la produzione di IFN γ da parte delle cellule NK e Th1
- induce la produzione di altre citochine, chemochine e recettori per chemochine
- induce la proliferazione dei linfociti T
- aumenta l'attività citolitica sia delle cellule NK che T (favorendo l'uccisione di cellule difettate anche da virus)

NB: IL12 è all'inizio stata chiamata NK Stimulating Factor, scoperta studiando la linea dei linfociti B e il suo clonaggio è stato molto complicato perché si riteneva che fosse un'unica citochina invece di fatto erano 2 (eterodimerica)

il prof salta le slide che riassumono quanto detto prima

Slide Antitumoral effects of IL12

Essendo una molecola che attiva la risposta Th1 presenta anche un'azione antitumorale.

Infatti agendo sulle cellule NK, sui CD4+, sui CD8+ e stimolando la produzione di IFN γ.

Quindi ha un'attività tumorale indiretta:

1. perché è mediata dalla produzione dell'IFN γ
2. perché a sua volta IFN γ esercita la sua azione antitumorale utilizzando una serie di altri meccanismi quali ad esempio l'aumento IP-10 e MIG ovvero chemochine (CXCL9 e CXCL10) che vanno ad agire sui linfociti Th1, ma hanno anche azione angiostatica. Se

infatti si somministra IL12 a un animale con tumore una delle cose che si osserva è una diminuzione dell'angiogenesi.

Al clonaggio della IL12 è seguito il clonaggio di altre interleuchine eterodimeriche, quindi ad es. l'IL23, IL27 e due/tre anni fa IL35.

Questa famiglia di citochine ha recettori con catene in comune, ma non solo anche i veri e propri componenti delle stesse citochine ovvero le subunità sono in comune.

IL23 ha la catena p40 comune con IL12 e un'altra catena detta p19

IL27 e IL37 hanno in comune la ep3 *(non sono sicura, non riesco a capire dalla registrazione)* ma non la seconda catena, che nel caso della la IL27 è la catena p28, nel caso della IL35 è la p35 (in comune con la IL12).

Questa famiglia di citochine lega poi dei recettori costituiti da catene che attivano anche questi le vie JAK – STAT sia con elementi condivisi che specifici per ogni citochina.

Le funzioni biologiche di queste citochine sono molto diverse tra di loro e una stessa citochina può avere azioni opposte tra loro: generalmente si va da azioni pro-infiammatorie indotte dalla IL12 e dalla IL23 ad azioni inibitorie, immunosoppressorie e quindi anti-infiammatorie esercitate principalmente, ma non esclusivamente, dalla IL27 e dalla IL35.

Lezione di Patologia generale e fisiopatologia clinica (sem2) del 27/3/2013 (1)

Lezione di Patologia Generale e Fisiopatologia del 27/03/2013

Prof. Minuz

Sbobinatore: Francesca Ligorio

Revisore: Chiara B. Santoro

(Tutte le slide sono dalla lezione "Scompenso cardiaco")

Riprendiamo il problema dell'insufficienza cardiaca e della sue manifestazioni, che sono legate all'attivazione di meccanismi di compenso come l'attivazione del sistema adrenergico o l’attivazione di una risposta umorale (cosiddetta) che è determinata dal rilascio di ormoni e di sostanze emodinamicamente attive come l'angiotensina.

(Slide “Cause di insufficienza cardiaca”)

I meccanismi possono essere **intrinseci al cuore** oppure essere legati a **sovraccarico di volume**, indipendentemente dalla patologia del miocardio (tipico esempio sono i vizi valvolari, soprattutto l'insufficienza mitralica e l'insufficienza aortica) o **sovraccarico di pressione**.

Il tipo di risposta nei primi due casi è di tipo dilatativo (ipertrofia eccentrica), nel caso di sovraccarico di pressione è un'ipertrofia di tipo concentrico.

(Slide successiva) Se passiamo sull'aspetto clinico, quali sono le condizioni che più frequentemente determinano lo sviluppo di insufficienza cardiaca e di conseguenza portano a scompenso cardiaco?

In assoluto le condizioni più comuni sono due condizioni ***(diabete e ipertensione arteriosa)*** che non riguardano direttamente il cuore se non come conseguenza di una serie (soprattutto nel caso del **diabete**) di alterazioni strutturali e funzionali del circolo. Si ha un danno microvascolare associato a una progressione molto rapida dell'aterosclerosi; questo determina primariamente un danno della funzione del miocardio attraverso un danno indotto dall'alterazione del circolo nutritizio; tuttavia è possibile che ci siano degli effetti diretti dell'iperglicemia sulla funzionalità e sulla struttura del miocardio stesso *(nel caso del diabete, Ndr).*

L’ipertensione arteriosa è un classico esempio di condizione che determina precoce insorgenza di ipertrofia e successivamente porta a una dilatazione del cuore.

Queste due sono in assoluto le patologie cardiovascolari più comuni (diabete e ipertensione arteriosa)

Poi c'è la **cardiopatia ischemica**, cioè la malattia ischemica, ovvero un basso afflusso sanguigno, determinata da una malattia intrinseca dei vasi coronarici, cioè l'aterosclerosi coronarica. Ovviamente queste tre condizioni, visto che il diabete mellito induce aterosclerosi e che l'ipertensione arteriosa induce aterosclerosi sono intersecate tra di loro in modo così stretto da determinare molto frequentemente un quadro di tipo misto (diabete con cardiopatia ischemica, cioè con una malattia ischemica delle coronarie, oppure l’iperteso che ha una malattia arteriosclerotica delle coronarie, e poi si ha anche una stretta relazione tra diabete e sviluppo dell'ipertensione; se ne era parlato anche a lezione quando si parlava di meccanismo di danno vascolare e di disturbo endoteliale)

Poi ci sono delle condizioni di **miocardiopatie**, che possono essere molto spesso su base genetica : anche qui ci sono delle strette connessioni tra modalità di danno della cellula, della struttura e della funzione miocardica. Questo attraverso due principali meccanismi: uno che modifica la forza contrattile, uno che modifica l'architettura citoscheletrica della cellula. Ciò determina, nel primo caso, più frequentemente delle forme ipertrofiche, nel secondo delle forme di tipo dilatativo.

Le cardiopatie infiammatorie (= **miocarditi**) sono processi infiammatori che hanno una genesi il più delle volte innescata da meccanismi di tipo infettivo virale, meno frequentemente batterico, e che determinano morte cellulare, infiammazione miocardica, alterazioni strutturali del miocardio, e alla fine una perdita di contrattilità che determina una condizione di cardiopatia dilatativa.

Le miocarditi e le cardiomiopatie sono le cause più subdole, tra quelle che possono determinare uno sviluppo del processo di insufficienza cardiaca, perché spesso non c'è un momento di riconoscimento della malattia (cosa che può essere facilmente riscontrata invece nel diabete o nell' ipertensione arteriosa).

Tra le miocardiopatie tenete presente che ci sono molte forme legate anche ad alterazioni metaboliche più complesse, come la siderocromatosi, in cui il danno miocardico è parte di una serie di impegni d'organo legati ad alterazioni metaboliche del ferro.

Le **cardiopatie tossiche**, di cui la più nota è sicuramente quella etilica, determinano ancor una volta meccanismi di danno attraverso aumento dello stress ossidativo, produzione di sostanze tossiche, morte cellulare, attivazione del processo infiammatorio, e quindi un quadro riparativo che porta a perdita di contrattilità.

Le **valvulopatie** da un punto di vista epidemiologico pesano meno, ma progredendo verso età più avanzate l'età media della popolazione, si sta sviluppando una condizione molto comune di malattia valvolare aortica, che in tutto e per tutto è una manifestazione dell'aterosclerosi. Un impegno aterosclerotico dell'aorta può coinvolgere le valvole aortica.

Le forme degenerative di valvulopatia aortica, che possono essere una stenosi (che dà un incremento della pressione nelle camere cardiache e quindi un' insufficienza cardiaca con sviluppo di ipertrofia di tipo concentrico) sono condizioni che si stanno sviluppando molto frequentemente nelle fasce della popolazione con età più avanzata.

L'impegno valvolare, abbiamo detto, non è frequente; una volta era molto frequente il danno infiammatorio dovuto alla malattia reumatica (sequela tardiva dell'infezione da streptococco beta emolitico, che determinava una risposta autoimmunitaria e quindi un danno infiammatorio post

infettivo). Adesso le forme più comuni sono sicuramente quelle legate ai processi degenerativi che trovano una genesi comune alle malattie aterosclerotiche.

Sulla sinistra*(della slide)* ci sono quindi le condizioni, in assoluto più comuni come numero, che portano a un danno miocardico.

Ci sono altre condizioni *(sulla destra)* in cui prevale il meccanismo di disturbo del circolo che solo secondariamente dà alterazioni della funzionalità miocardica.

Il primo esempio è **l'anemia**: in una condizione di bassa capacità di trasporto dell'ossigeno; l'ossigenazione dei tessuti è mantenuta (vedremo già oggi stesso come si instaurano questi meccanismi) attraverso un'attivazione cardiocircolatoria che passa attraverso l'attivazione di una risposta di tipo adrenergico, per cui aumenta la frequenza cardiaca, aumenta l'output cardiaco e ciò determina la condizione di aumentato lavoro cardiaco.

In condizioni in cui ci si avvicina, già a riposo, ad avere esaurito la riserva funzionale cardiaca, la presenza di un aumento di lavoro cardiaco determina una condizione di insufficienza di circolo. *(forse sottintendeva con l'inizio di attività, ovvero quando subentrano meccanismi di compenso? Non è chiaro, la frase detta è quella riportata, Ndr)*

L'anemia può determinare delle manifestazioni che sono per certi aspetti del tutto sovrapponibili alla quelle della classica insufficienza cardiaca, cosiddetta bassa gittata, come sono tutte quelle condizioni sulla sinistra; tuttavia ha una progressione con tempi completamente diversi rispetto a quelli delle altre malattie, che si sviluppano negli anni; la condizione di anemia raramente può essere una condizione di lunga durata.

Un'altra condizione in cui si determina una condizione di aumento di lavoro cardiaco per alterazione del circolo periferico, ma anche per un eccesso di attività cardiaca intrinseca, è **l'ipertiroidismo**. Nell'ipertiroidismo si ha una facilitazione dell'attività adrenergica. Per cui da una parte ho un circolo ipercinetico con basse resistenze, aumento della velocità di circolo e aumento, in un certo senso compensatorio, della frequenza cardiaca; ho poi anche un aumento dell'attività adrenergica intrinseca legata allo stato di ipertiroidismo: ho un aumento della contrattilità, della velocità di contrazione e un aumento della gittata cardiaca che determinano un aumentato lavoro cardiaco. Dall'altra anche una cardiotossicità diretta, per cui anche un effetto di danno miocardico da ipertiroidismo.

Infine l' insufficienza cardiaca che si determina in presenza di basso ritorno venoso e basse resistenze vascolari periferiche, come nello **shock**.

Quello che vi ho fatto adesso è un brevissimo excursus, non ha intenti di tipo esplicativo sui meccanismi. Tenete solo conto delle condizioni che possono determinare insufficienza cardiaca, senza entrare in questo momento nel dettaglio di queste.

(Slide "DALL'INSUFFICIENZA ALLO SCOMPENSO: la dispnea da sforzo e a riposo, gli edemi)
Quali sono le conseguenze circolatorie dell' insufficienza cardiaca, cioè cosa succede all'organismo, essenzialmente? La prima cosa l'abbiamo vista: se è disfunzionante il ventricolo sinistro, perché la pressione è eccessiva, o perché non c'è contrattilità, avremo un aumento delle pressioni nel circolo venoso polmonare e quindi un aumento delle pressioni capillari. La conseguenza è un **edema intersiziale, alveolare a livello polmonare**.

Il termine "**rallentamento del circolo**" va inteso in senso funzionale, non che rallenti la velocità. Meglio definirlo come "modificazione negativa del circolo polmonare".

Essendoci un'alterazione dello spessore dei setti a livello alveolare si avrà **minore capacità di diffusone dell'ossigeno**: lo scompenso cardiaco si accompagna necessariamente a un minore scambio a livello polmonare, quando si determinano quelle condizioni che avete visto.

E in più si ha, per effetto della minore capacità di spinta in avanti, una ripercussione, più o meno precoce, sul circolo polmonare, poi sul cuore di destra e di conseguenza sul **ritorno venoso** *(sistemico, ndr).* Quindi si avrà un aumentato pooling venoso, cioè un aumento delle pressioni e dei volumi nel circolo venoso. Vedremo già oggi che in condizioni di alterazioni intrinseche del circolo polmonare (e non secondarie allo scompenso del cuore di sinistra) si hanno le stesse condizioni: un aumento delle pressioni e dei volumi nel cuore di destra, quindi aumento delle pressioni e dei volumi nel circolo venoso sistemico.

Una riduzione relativa o assoluta, rispetto alle necessità, della gittata sistolica sono ovviamente tutte condizioni che si ritrovano, che sono ascrivibili alla disfunzione del cuore di sinistra, così come anche un eccesso di pressione o anche condizioni ipercinetiche o comunque un valore ridotto rispetto alle necessità. Quindi in termini assoluti o in alcune condizioni in termini relativi. *(Ho riportato quanto detto con qualche modifiche in modo che almeno grammaticalmente abbia un minimo di senso. Per quanto riguarda il contenuto non è chiaro. Riporto comunque tutto. Ndr)*

Come ultima conseguenza si ha, per effetto della bassa gittata, **un effetto di ipossia tissutale.**

Lo scompenso cardiaco determina una bassa ossigenazione dei tessuti; questo di per sé giustifica le manifestazioni più comuni dell'insufficienza cardiaca e dello scompenso cardiaco: **il deficit della forza**.

La progressione, la stadiazione dello scompenso cardiaco si definisce in termini di variazioni della capacità di svolgere un lavoro fisico: quelle che si chiamano classi funzionali 1a, 2a, 3a e 4a sono definite integralmente dalla capacità di svolgere lavoro.

Brevemente vi accenno ai meccanismi e ad alcuni aspetti della **cardiopatia ischemica,** perché merita di essere dettagliata maggiormente rispetto alle altre.

(vedi slide "CARDIOPATIA ISCHEMICA")

La cardiopatia ischemica è una delle più comuni cause di scompenso cardiaco; un cuore ischemico è un cuore che non riesce a svolgere la sua funzione e va anche incontro ad un rimodellamento strutturale e a fenomeni di ipertrofia eccentrica. Le cause dalla cardiopatia ischemica sono le stesse cause dall'aterosclerosi, essenzialmente.

Quindi avrete tutte le condizioni che trovate definite come fattori di rischio (ma sono fattori causali) dell'aterosclerosi, come determinanti della malattia cardiaca ischemica. Il meccanismo iniziale è sempre lo stesso (ve ne ho accennato per quanto riguarda la disfunzione endoteliale e il meccanismo di innesco nella malattia aterosclerotica): a livello coronarico, dopo lo sviluppo di una placca aterosclerotica in cui c'è un core lipidico (questa *,riferito all'immagine della slide Ndr,* è una lesione molto avanzata, è presente molto materiale necrotico e infiammatorio) si fissura il cap fibroso, si ha deendotelizzazione, e quindi esposizione di una superficie fortemente trombogenica. Si ha pertanto l'adesione e l'aggregazione piastrinica sulla superficie del vaso sede della fissurazione.

NB: per quanto disfunzionante l'endotelio di solito non determina una massiva formazione di trombi ma piuttosto determina fenomeni adesivi piastrinici e piccoli aggregati; è la fissurazione, con l'esposizione del materiale trombogenico presente nella placca lipidica e nel sottoendotelio a determinare da una parte l'attivazione piastrinica dall'altra l'espressione di fattore tissutale. Si ha la formazione, da parte di piastrine attivate, e dal rilascio di materiale cellulare derivato dalla placca, di"microparticles" che contengono appunto fattore tissutale.

Quello che accade è una sinergica e molto rapida attivazione delle piastrine e della cascata coagulativa. Quello che caratterizza in modo tipico la formazione del trombo della sua placca aterosclerotica è che il processo è molto rapido, e che è favorito da uno stato di pre-attivazione piastrinica e dall'elevata trombogenicità del materiale contenuto sotto l'endotelio.

Quando la placca si rompe, la crescita del trombo, non sono in senso longitudinale, ma sopratutto in senso trasversale rispetto alla sezione del vaso, è molto rapida.

(Slide ”Infarto miocardico con sopraslivellamento ST”)

Se l'accrescimento del trombo è tale da portare all'occlusione vascolare, si avrà un arresto del flusso sanguigno. Immaginiamo che riguardi una coronaria: avremo una **necrosi ischemica** del tessuto a valle e l’innesco di fenomeni di apoptosi nelle porzioni più periferiche del miocardio ischemizzato. L'area non funzionante cardiaca è funzione della quantità di tessuto che è irrorato da un singolo vaso: tanto più l'occlusione è prossimale e tanto più riguarda vasi di calibro maggiore, che hanno ampie aree d’irrorazione miocardica, tanto più grave sarà il fenomeno ischemico miocardico. (Ricordate l'anatomia: c'è un ampia circolazione collaterale ma

sostanzialmente quella coronaria ha l'aspetto di una circolazione terminale).

Questo *(l’infarto)* si esprime attraverso un'alterazione della funzionalità della conduzione elettrica, rilevata nelle fasi di depolarizzazione, ma, soprattutto nelle fasi iniziali del fenomeno, nel processo di ripolarizzazione.

Inoltre si ha l'evidenza di rilascio di materiale cellulare: alcuni di questi sono enzimi o proteine proprie della struttura miofibrillare, come la **troponina** (T e I). Questi possono essere espressione dell'entità del danno ischemico, cioè del numero di cellule che è stato coinvolto nel processo di degenerazione.

L'entità del danno cellulare quindi è letta da un biomarcatore che è un indice quantitativo dell'entità del danno, oltre che essere letta dalle alterazioni della funzionalità nella conduzione elettrica (della depolarizzazione più tardivamente e della ripolarizzazione, che invece è un aspetto precoce delle manifestazioni delle perturbazioni della conduzione elettrica nel cuore ischemico).

Tuttavia non sempre il trombo porta a completa occlusione: è frequente che ci sia una lisi parziale (i fenomeni di trombolisi e disagregazione piastrinica sono sempre possibili in una certa misura). Alternativamente l'entità della rottura di placca è quindi modesta (si ha quella che è detta "fissurazione di placca") e quindi l'entità del trombo che si genera è più ridotta. Oppure il vaso potrebbe essere più ampio *(credo intendesse che o si ha una lisi parziale che quindi non istruisce completamente un vaso che sarebbe stato ostruito da una lisi chiamiamola totale oppure che la lisi è totale ma non ostruisce il vaso perché questo è più ampio, Ndr).*

Il risultato è quindi in questo caso il fatto che non si ha un'occlusione completa del vaso, ma una riduzione del suo lume: ciò determinerà, al suo interno, una diminuzione della pressione, un aumento della velocità del flusso con riduzione, sopratutto se l'entità della stenosi è molto severa, del flusso a valle. Una condizione di questo determina **un'ipoperfusione miocardica** a valle dell'area dove è presente la stenosi. Questo comporterà una perdita dell'efficienza contrattile legata allo stato ipossico. Qui diventa importante l'entità del lavoro cardiaco: se un soggetto presenta restringimento di una coronaria, e la coronaria irrora un'ampia porzione del miocardio, il cuore sarà

ipocinetico. Questo può essere sufficiente a determinare una normale funzionalità miocardica in condizione di riposo; se il soggetto però si sottopone ad un'attività fisica (comincia a camminare, a correre), si avrà un peggioramento dello stato ischemico. (Questo non perché in assoluto si sia ridotto il flusso sanguigno ma perché aumenta la discrepanza tra necessità metaboliche del tessuto miocardico e disponibilità di ossigeno).

Si determina una condizione di ischemia che ha il carattere di transitorietà (se arresto l'attività fisica si arresta o riduce anche il deficit di ossigenazione) che si accompagna ai segni tipici della condizione di ischemia**: il dolore** (si rilasciano sostanze che stimolano le terminazioni nervose), **alterazioni elettrocardiografiche** che rispecchiano le precoci alterazioni nella ripolarizzazione. Queste sono le stesse che vedo nell'ischemia miocardica in presenza di un infarto.

Posso avere anche un certo grado di danno cellulare con rilascio di enzimi o proteine muscolari che possono essere letti come biomarcatori di un'ischemia.

Quello che vi ho descritto è un condizione di **ANGINA STABILE**: ho una placca, che non si è modificata, che determina una stenosi e che dà segni di sè solo in condizioni di aumentato lavoro cardiaco. Ci sarà ovviamente una condizione di ipossiemia persistente, però relativa, non assoluta come nelle ischemie da occlusione.

Chiaramente siamo davanti a un cuore ipossico, che subirà tutti gli effetti, in termini di rimodellamento strutturale: tipici della condizione di ipossia: attivazione di fattori trascrizionali legati all'ipossia, attivazione di una cascata infiammatoria, fenomeni apoptotici a livello delle cellule muscolari, rimodellamento della matrice extracellulare e quindi una progressione verso un cuore ipocinentico con bassa contrattilità, che tendenzialmente va incontro a un processo dilatativo.

(Slide "Angina instabile, infarto senza sovraslivelllamento del tratto ST)

Un'ultima condizione che si può verificare: se il trombo, che non determina completa occlusione del vaso, rilascia del materiale, (i frammenti di trombo vengono definiti **emboli)**, questo trascinato dalla corrente sanguigna andrà a occludere dei vasi di calibro più piccolo. E' una condizione che può portare a morte cellulare, a delle aree ischemiche, però tendenzialmente è un'ischemia per aree più ridotte, meno ampie di quelle che si avrebbero se il vaso si fosse chiuso più a monte.

E' quello che dal punto di vista fisiopatologico sottostà a quelle che sono definite **ANGINE INSTABILI**. La necrosi è parcellare, cosiddetta "non transmurale" (vecchia terminologia; esprime semplicemente la minore entità del numero di cellule coinvolte nel processo). Gli emboli possono prendere diverse direzioni: l'area ischemica è quantitativamente ridotta, però può essere relativamente ampia. Infatti non si libera un solo embolo, possono essere più frammenti di trombo che si liberano e quindi il processo può avere un'estensione apparente più ampia di quanto non avrebbe se fosse colpito un solo piccolo vaso. *(Quindi ogni piccolo frammento determina un danno di estensione ridotta ma in relazione, relativamente, alla quantità di frammenti rilasciati dal trombo l'area totale danneggiata è più ampia. Ndr)*

L'entità di morte cellulare è necessariamente ridotta in queste condizioni. Questa è la base fisiopatologica della gran parte delle sindromi coronariche acute che vengono definite **"senza sovraslivellamento del tratto ST**". Non sviluppano un'area così estesa di necrosi tissutale da dare alterazioni ECGrafiche tipiche dell'alterazione della fase di depolarizzazione (che sono poi la

comparsa del'onda Q *(anomala, Ndr*) e altre alterazioni ECGrafiche), che compaiono in modo stabile dopo un infarto massivo.

Si generano invece delle transitorie alterazioni più o meno perstenti della fase di ripolarizzazione.

Dal punto di vista dei biomarcatori ci si troverà in una condizione intermedia tra quello che è un infarto, che determina morte cellulare massiva e quindi rilascio notevole di proteine muscolari (letto come espressione di infarto miocardio), e l'angina stabile, in cui è rilasciato zero o pochissimo materiale.

Si configura come una condizione intermedia. E' un infarto dal punto di vista del meccanismo, ma ha degli aspetti di incompletezza perchè i vasi impegnati sono più piccoli. Ha le sue tipiche manifestazioni, anche dal punto di vista clinico: la comparsa del dolore, il deficit funzionale cardiaco acuto (tutte le manifestazioni tipiche dell'infarto) però in misura ridotta, senza che si determini una morte di un ampio parenchima tissutale.

(Slide: "Compenso mediante dilatazione" o almeno credo, non avendo a diposizione le slides di quest'anno mi riferisco a quelle dell'anno scorso e a miei appunti, quindi non sono sempre sicura al cento per cento del riferimento; Ndr) Quando un cuore va incontro a un infarto abbiamo morte cellulare, flogosi, fibrosi e uno stato di ipossia tissutale persistente, per cui il rimodellamento cardiaco sarà a carico di un'area più estesa di tessuto miocardico di quella inizialmente soggetta a morte. Quindi quest'area *(credo indichi quella necrotica, Ndr)* diventa un tessuto fibroso con un basso contenuto di cellule. Si hanno fenomeni di apoptosi e di rimodellamento della matrice extracellulare per cui alla fin fine un cuore di questo tipo va incontro a una cardiopatia dilatativa, dettata da una bassa o assente contrattilità in quest'area (*quella infartuarta, Ndr*) ma anche da una progressiva perdita di contrattilità nelle aree periferiche (questo anche perché se c'è stato un fenomeno trombotico in un vaso molto probabilmente negli altri vasi si hanno fenomeni di stenosi e di restringimento del lume e in generale di alterazioni microcircolatorie che giustificano pienamente uno stato di ipossia tissutale).

(Slide "Età e scompenso cardiaco")

Infine un'ultima considerazione: il fenomeno dello scompenso cardiaco è legato a tutte le condizioni viste prime, però per certi aspetti l' insufficienza cardiaca, come pure l'insufficienza renale, il deficit degli organi ecc… accompagna il processo dell'invecchiamento. I motivi sono vari: la pressione tende ad essere più alta perché i vasi sono più rigidi, la capacità di svolgere lavoro cardiaco si riduce perché un certo grado di rimodellamento cardiaco si ha comunque nel tempo. Quindi la perdita di funzionalità cardiaca si associa invariabilmente, attraverso una serie di meccanismi di rimodellamento che sono legati anche all'aumento della componente lipidica nei tessuti, compreso il miocardio, e ad un aumento della componente fibrosa interstiziale, ad una condizione di sempre minore riserva funzionale e sempre maggiori elementi di insufficienza e franco scompenso cardiaco.

E' una condizione come quella dell' ipertensione arteriosa, che diventa addirittura prevalente nella maggior parte della popolazione rispetto alla condizione di non patologia. Sopra i 65 anni ci sono più ipertesi che normotesi, nella popolazione; sopra fasce di età di quest'ordine si hanno condizioni di insufficienza cardiaca più o meno manifesta, tanto che molti di questi presentano un quadro di franco scompenso cardiaco.

(Slide "Segni e sintomi dello scompenso")

Qui c'è un elenco delle manifestazioni cliniche dello scompenso cardiaco. Ve ne segno alcune soltanto, in ordine di rilevanza: la **dispnea** (difficoltà respiratoria) è la prima manifestazione delle fasi acute della malattia: la mancanza di ossigenazione è il segno più tipico di un'insufficienza acuta di cuore. L'edema e la tachicardia sono elementi sempre presenti.

Nello scompenso cronico l'accumulo idroelettrolitico, cioè l'aumento di acqua e di sali nell'organismi e quindi **l'edema** dell'interstizio sono le più tipiche e comuni manifestazioni.

Quindi nella fase acuta dello scompenso è l'impegno polmonare che dà segno di sé (dispnea, difficoltà respiratorie), nello scompenso cronico, che si sviluppa più lentamente, oppure nelle fasi più avanzate, superata la fase acuta, è l'edema l'aspetto più caratteristico dello scompenso di cuore.

Questa *(slide "Insufficienza cardiaca: storia ed evoluzione")* è l' evoluzione clinica della miocardiopatia; comunque in generale il più delle volte, tranne in casi relativamente poco frequenti è uno sviluppo che richiede molti anni.

(Slide "Evoluzione dello scompenso")

Determina un'elevata mortalità per lo scompenso cardiaco in sé e anche per le complicanze sull'attività elettrica del cuore che le condizioni di rimodellamento cardiaco possono determinare: o la morte ischemica oppure la morte cosiddetta elettrica, cioè l'alterazione della attività elettrica del cuore per cui compaiono aritmia fatali che determinano un'improvvisa perdita di forza del cuore, ad esempio blocchi avanzati ma soprattutto fenomeni di arresto cardiaco oppure di tachicardia ventricolare; studierete più avanti che le condizioni di alterazione grave dell'eccitabilità e della conduzione elettrica del cuore determinano una alterazione funzionale improvvisa e quindi la morte.

SISTEMA RESPIRATORIO

(slide dalla lezione "Sistema respiratorio")

Ora tratteremo le interazioni tra sistema respiratorio e cardiaco, e la componente relativa al cuore di destra. Vedremo anche le patologie polmonari.

La funzione polmonare è quella di fornire l'ossigenazione ai tessuti attraverso lo scambio di ossigeno tra l'ambiente esterno e l'ambiente circolatorio; la disfunzione respiratoria è strettamente correlata con la disfunzione cardiaca.

Abbiamo già visto un aspetto legato all'insufficienza cardiaca, l'edema polmonare. Vedremo ora come anche le patologie polmonari possono determinare un'alterazione della funzionalità miocardica tale da indurre una condizione di scompenso cardiaco. La storia va sempre vista tenendo presente il circolo sistemico, di cui vi ho parlato fino ad adesso (abbiamo visto l'ipertensione arteriosa e l'insufficienza cardiaca, puntando quasi sempre sul problema del cuore di sinistra e quindi sugli effetti sul circolo sistemico). Vediamo adesso quello che implica un'alterazione della funzionalità respiratoria in termini di funzionalità cardiaca e poi vediamo di per sé le alterazioni della funzionalità respiratoria in termini fisiopatologici.

(*Slide “Unità cuore-polmoni”)*

Avendo parlato di cuore, abbiamo sostanzialmente parlato del cuore di sinistra. C'è invece una stretta connessione per quanto riguarda le funzionalità sia del cuore di sinistra, ovviamente, ma sopratutto del cuore di destra, tra il circolo polmonare e l'apparato respiratorio. Questo è ovvio: la funzione in termini finalistici e fisiologici dell'apparato respiratorio è quella di permettere che dall'ambiente esterno venga assunto l'ossigeno che serve ai tessuti per generare energia.

Quindi la funzionalità polmonare è strettamente connessa alla capacità del circolo di portare sangue in prossimità degli alveoli in un quantitativo idoneo ad essere ossigenato e in misura sufficiente alle necessità metaboliche dell'organismo: la funzione respiratoria necessariamente deve integrarsi perfettamente con la funzione cardiocircolatria

Vedremo che questa integrazione si manifesta anche dal punto di vista anatomo-funzionale.

Ci deve essere

- un adeguato **ritorno venoso**;

- una funzionalità del cuore di destra tale da portare sangue in maniera adeguata al circolo capillare (*polmonare*);

- dal versante periferico deve esserci un circolo nutritizio capillare adeguato in modo da **permettere gli scambi a livello tissutale**.

- Un circolo che comprende, in successione, l'andata arteriosa, i capillari periferici, il ritorno venoso, il cuore di destra, il circolo polmonare, il cuore di sinistra.

L'integrazione viene esemplificata da quello che accede **nell'attività motoria**. In questa aumenta la frequenza cardiaca, perché si ha un segnale che arriva dalla periferia; c'è però anche un segnale che arriva dall'iniziale consumo di ossigeno per cui si attiva, insieme all'apparato cardiaco, anche l'apparato respiratorio.

Anzi sono più gli stimoli dell'apparato respiratorio, che non quello inizialmente circolatorio che determinano l'aumento della attività cardiaca.

(Durante l'attività fisica, Ndr) migliora il ritorno venoso, migliora la performance cardiaca, migliora la perfusione polmonare e quindi questo adegua gli scambi alle necessità metaboliche (l'interstizio a livello alveolare è quello dove avvengono gli scambi: c'è uno stretto contatto, meno di un micron, tra sangue e aria).

Il cuore è implicato, ovviamente. La funzionalità del cuore di sinistra è importantissima perché permette la distribuzione ai tessuti. Il cuore di destra durante la contrazione cardiaca è come se fosse trascinato, come una sorta di sacco appoggiato al cuore di sinistra: anche se avesse una bassa contrattilità si potrebbe svuotare abbastanza bene, tanto che se ci fosse un infarto del cuore di destra darebbe inizialmente solo delle scarse manifestazioni di sé. Se il cuore di sinistra è ben funzionante, il cuore di destra finisce per essere trascinato, più che contrarsi. Ovviamente si contrae, però è anche passivamente trascinato dalla contrazione del cuore di sinistra.

Queste condizioni, quando c'è una perturbazione del circolo polmonare possono essere molto alterate: il cuore di destra può diventare un problema per il cuore di sinistra. *(Riporto quanto detto, non ha dato ulteriori spiegazioni. Ndr)*

(Slide successiva "Unità cuore polmoni")

La struttura cardiaca è contenuta nel mediastino è subisce anche, come pure il circolo, le variazioni di pressione determinate dai movimenti della cassa toracica.

Sono due gli aspetti che vanno tenuti sempre presenti.

La pressione intratoracica, infatti, è data da due componenti:

1. **la pressione pleurica**, che in realtà è la pressione dell'interstizio. "Pleurica" perché è determinata dalla trazione della cassa toracica; è quindi una pressione che si determina in senso negativo: più ampia è la cassa toracica meno è la pressione interstiziale (=pleurica) *(cioè più negativa è, Ndr).*

2. **La pressione alveolare**, che è una variabile molto discontinua: si passa da pressione 0 in fase di apnea, a massima pressione positiva nelle fasi di contrazione della cassa toracica, massima pressione negativa durante l'espansione della stessa.

(Slide Unità cuore-polmoni (2))

Il circolo polmonare a sua volta si distingue in

- un circolo **extraalveolare**, che bypassa gli alveoli, che serve da riserva funzionale e può essere reclutato, ad esempio, durante l'attività fisica più intensa.

- il circolo ***(intraalveolare, Ndr),*** che viene deviato verso i capillari a livello degli spazi alveolocapillari, dove avvengono gli scambi.

Ci sono quindi in gioco molte forze a livello del parenchima polmonare che possono determinare variazioni di flusso capillare.

L'attività respiratoria determina una variazione del flusso a livello del circolo intrapolmonare. Se espando la cassa toracica avrò uno stiramento ma anche una minore pressione all'esterno, quella che si chiama **pressione transmurale**. Lo stiramento determina un aumento delle resistenze, la distensione determina invece una riduzione della resistenza al flusso. La risultante netta di solito, nella fase iniziale dell'inspirazione, è un aumento del flusso stesso. Nelle fasi terminali dell'inspirazione lo stiramento potrebbe determinare una maggiore resistenza rispetto a quanto non sia la *(diminuzione di resistenze data dalla)* depressione della cassa toracica, per cui si può determinare un certo grado di aumento di resistenze.

Nella fase esplusiva invece le resistenze al flusso sono maggiori perché avrò sia un aumento della pressione alveolare che la riduzione della depressione interstiziale. Quindi il flusso intrapolmonare viene ostacolato, in questa fase.

Il flusso quindi risente fisiologicamente delle variabili legate alla motilità della cassa toracica; risente però anche degli **aspetti strutturali del parenchima polmonare**. Se ho un tessuto, che anziché essere fortemente elastico con dei setti molto sottili, è tendenzialmente fibroso, (come può accadere a seguito di patologie infiammatorie croniche, o a seguito di fenomeni di rimodellamento strutturale come la fibrosi, determinata da vari meccanismi) avrò che le capacità di modulare, durante le fasi del ciclo respiratorio, le resistenze al flusso *(suppongo volesse terminare con "sono ridotte". Credo, ma lo aggiungo io. Il professore non termina la frase, Ndr).* Questo non tanto per alterazioni della struttura vascolare, quanto per alterazioni della circostante struttura interstiziale.

Se queste condizioni determinano un aumento della pressione dall'esterno (cioè la pressione transmurale aumenta perché l'interstizio è poco elastico), non si trasmette la distensione della cassa toracica nel parenchima, quindi il vaso non modifica i suoi flussi in funzione della variazione della pressione transmurale. In queste condizioni avrò un tendenziale incremento delle resistenze al flusso.

Quindi si tenga presente che una quota *(di cosa? Ndr)* è fisiologica e permette un elevatissimo adeguamento funzionale del circolo polmonare, e una quota è patologica e tanto più si manifesta tanto più, di solito, si determina un aumento delle resistenze al flusso intrapolmonare.

Poi dobbiamo tenere presente che in un flusso a basse pressioni come quello del circolo polmonare, la **forza di gravità** determina delle ridistribuzioni fisiologiche dei flussi intrapolmonari che fanno sì che la funzionalità degli scambi respiratori non sia sempre così elevata come dovrebbe. Teniamo quindi presente questa alterata distribuzione fisiologicamente determinata dalla pressione *atmosferica (intende gravità? Ndr)* che fa sì che in certe condizioni, quando poi si sviluppa una patologia polmonare, la capacità di adattamento funzionale sia poi ridotta anche per questo.

I flussi tendono essere più abbondanti verso le basi polmonari rispetto agli apici in posizione eretta.

Infine c'è un'elevata capacità di adattamento del circolo polmonare che è in buona parte determinato **dal rilascio di fattori** che determinano la contrattilità delle cellule muscolari nel tratto arteriolare polmonare. Sono molto importanti e sono per certi aspetti molto differenti da quelli che operano nel circolo sistemico. Tipico esempio è l'**O_2**: una bassa pO_2 nel circolo polmonare determina una vasocostrizione; una bassa pO_2 nel circolo sistemico determina una vasodilatazione.

Un'alta **pCO_2** nel circolo polmonare determina vasocostrizione, un'alta pCO2 nel circolo sistemico determina vasodilatazione.

In più c'è un abbondantissima produzione di sostanze vasodilatanti come **prostacicline** e **ossido nitrico**, che contribuiscono non poco a far sì che il circolo polmonare sia altamente compliante (cioè abbia un'elevata distensibilità).

Quindi c'è una regolazione fisiologica del tono vascolare del circolo polmonare arterioso, cioè quello che porta il sangue dal cuore di destra al polmone, che fa sì che il circolo sia caratterizzato da fenomeni di vasomotilità e regolazione dei flussi che sono autonomi e diversi rispetto al circolo sistemico. Anche alcuni composti normalmente vasodilatatori nel circolo arterioso sistemico, come alcuni **eicosanoidi**, sono vasocostrittori nel circolo polmonare: c'è una notevole differenziazione nella risposta funzionale delle arteriole polmonari rispetto a quelle sistemiche. Tenetelo presente perché la **vasocostrizione ipossica** è uno dei fenomeni che peggiora la funzione respiratoria in condizioni di deficit polmonare.

Una conseguenza diretta di queste caratteristiche intrinseche (probabilmente si tratta di caratteristiche delle cellule endoteliali e della parete vascolare che tende ad avere una struttura muscolare molto meno organizzata, proprio perchè lavora a regimi pressori più bassi) è che nel circolo polmonare non esiste il fenomeno dell'aterosclerosi. La malattia aterosclerotica nel circolo polmonare non si manifesta. Questo molto probabilmente perché ci sono pressioni molto diverse ma anche perché c'è un comportamento dei flussi e delle attività secretiva dell'endotelio tale da proteggere dai meccanismi che invece nel circolo sistemico portano al danno aterosclerotico.

Oltre alla circolazione polmonare esiste anche una circolazione sistemica che ossigena il tessuto polmonare: **la circolazione bronchiale**. Ovviamente fa un percorso inverso. Però finisce *(anche, Ndr)* nelle vene polmonari, per cui il sangue che esce dal polmone è misto: c'è una quota della circolazione sistemica, nutritizia (piccola rispetto al totale) e una quota di sangue che passa

attraverso il circolo polmonare, che a sua volta si divide in quella interalveolare (che serve agli scambi) e una quota che serve da riserva.

Se cominciate a correre la quota di circolo che passa nei setti alveolari aumenta: c'è un adattamento di tipo vasodilatante, perché c'è un'elevata distensibilità delle arteriole. Si ha un piccolo incremento di pressione nel circolo polmonare sufficiente a determinare a un maggiore flusso; c'è poi una vasodilatazione consensuale quindi l'adattamento dei flussi nel circolo polmonare è estremamente ampio: può aumentare fino a 8 volte sotto attività fisica. Questo perché c'è un fenomeno di reclutamento capillare molto ampio, che fa sì che durante l'attività fisica si abbia un aumento dei flussi pur con una piccola variazione della pressione nel circolo polmonare.

(Slide Unità cuore polmone (3))

Che cosa permette questo adattamento sincrono del circolo sistemico, del circolo polmonare, dell'attività cardiaca, e dell'attività respiratoria?

Essenzialmente ciò avviene perché ci sono i **barocettori** in periferia che sentono la distensione nelle arterie di grosso calibro: se c'è un minore stiramento si ha in risposta un'attività di tipo adrenergico.

Però se è aumentata l'attività fisica, uno dei trigger dell'aumento del lavoro cardiaco e della risposta di tipo adrenergico è in realtà data dalla variazione dei gas disciolti nel sangue. Ciò è possibile per la presenza di **chemocettori**, che sono distinti in due gruppi principali, chemocettori periferici e centrali.

I **chemocettori periferici**, presenti a livello carotideo (glomo carotideo) e a livello dell'arco aortico. Si tratta di cellule di origine neuroectodermica che hanno un'elevata sensibilità alla concentrazione di O_2 e, in misura minore, di CO_2 e H^+. Essi determinano, attraverso un segnale che passa attraverso l'apertura di canali del calcio, un rilascio di neuromediatori che vanno ad eccitare fibre nervose che vanno, attraverso i nervo glossofaringeo e vago, al centro respiratorio e sono in connessione anche al centro che controlla l'attività del cuore e del circolo.

Le vie efferenti agiscono attraverso la modulazione della risposta adrenergica e la modulazione dell'attività del vago: in presenza di bassa pO_2 in periferia si ha un'attivazione di tipo adrenergico. Questo determina un adattamento cardiocircolatorio. Il fenomeno principale determinato da una bassa pO_2 in periferia è però l'attivazione di un'attività respiratoria più ampia e più frequente per attivazione dei nuclei del centro respiratorio. Questa è un'area piuttosto complessa che implica più nuclei a livello bulbare.

C'è una seconda serie di **chemocettori, a livello bulbare**, in cui sono presenti cellule sensibili alle variazioni della concentrazione di H^+. A livello bulbare ci sono molte aree in cui sono presenti

neuroni che presentano questa sensibilità. Non sono in contatto con il circolo sistemico, perché c'è la barriera ematoencefalica. Sono sensibili quindi alle variazioni di concentrazione di idrogenioni all'interno del liquor: tanto più questa aumenta tanto più trasmettono uno stimolo per l'attività respiratoria. Gli idrogenioni possono essere generati per passaggio della CO_2 *(attraverso la barriera ematoencefalica),* che poi è trasformata in acido carbonico che poi a sua volta libera gli H^+. Quindi alti livelli di CO_2 portano a attivazione del centro respiratorio.

Vi ricordo poi che questo meccanismo di regolazione a livello dei chemocettori bulbari, in condizioni fisiologiche, tende a dare l'attività respiratoria di base, mentre le variazioni di pO_2 sono quelle che danno le più ampie variazioni dell'attività respiratoria, perché c'è un'elevata sensibilità dei chemocettori periferici alle variazioni di O2. C'è quindi una sorta di differenziazione funzionale, che è importante perché in condizioni di insufficienza respiratoria cronica i due sistemi possono dissociarsi nell'inviare segnali. Si può avere una desensibilizzazione a livello bulbare, per cui si risponde essenzialmente solo alle gravi ipossie.

Il risultato di tutto questo è che se si ha un' ipossia periferica a seguito di un'attività fisica intensa, si avrà un aumento dell'attività cardiaca e una risposta vasomotoria, ma soprattutto un aumento dell'attività respiratoria. La sincronia dei due eventi fa sì che gli scambi a livello alveolo-capillare migliorino e possano essere potenziati di 8 volte.

(Slide Unità cuore- polmoni (4))

L'attività meccanica della cassa toracica ha anche un'altra funzione, che abbiamo già visto: quella di determinare un miglioramento del ritorno venoso. Se iniziate un'attività fisica avrete un'attività respiratoria più intensa: questo contribuisce, insieme all'attività della pompa muscolare, a migliorare il ritorno venoso. Infatti la depressione che si determina nella cassa toracica durante l'inspirazione determina un miglior riempimento del cuore di destra. Secondo la legge di Frank-Starling questo migliora anche la contrattilità del cuore di destra stesso.

Il tutto è favorito anche dal sincrono miglioramento della contrattilità del cuore di sinistra e quindi si determina un più rapido svuotamento, e con maggiori volumi, del cuore di destra. Il cuore di destra infatti non solo si riempie di più e si contrae, ma viene anche trascinato dalla contrazione del cuore di sinistra. Questo aumenta molto la gittata nel circolo polmonare e i flussi a livello polmonare migliorano (si ha una vasodilatazione determinata dalla variazione di flusso e si ha, con una piccola variazione di pressione un'ampia variazione di flusso). Si ha reclutamento microcircolatorio e quindi aumenta il volume di sangue che passa attraverso il circolo interalveolare.

In condizioni di questo tipo l'aumento della pressione degli alveoli durante la fase inspiratoria ha un effetto negativo sul flusso, tuttavia questo effetto negativo non ha delle forti ripercussioni sull'entità del flusso stesso. La pressione alveolare aumenta però si ha contemporaneamente uno stiramento e

una depressione pleurica: in condizioni fisiologiche la risultante di questo equilibrio di forze esterne al lume capillare varia di poco i flussi. Cambierebbe tutto dovesse aumentare la pressione intraalveolare oppure l'elasticità polmonare: in questo caso la capacità di adattamento dei flussi diventerebbe molto minore.

(*Riferito a slide Unità cuore polmone (5)): 3. BIOUMORALI:* Di tutto questo vi ho già accennato, passerei oltre.)

(Slide Unità cuore polmone (5)): 4. FUNZIONALI

Quando si fa attività fisica l'incremento del circolo polmonare e sistemico diventano consensuali (si ampliano molto); interviene poi la ridistribuzione dei flussi in periferia. Nel distretto muscolare interessato all'attività fisica l'incremento di flusso può essere anche di 20 volte (ovviamente con dei decrementi in altri distretti come quello splancnico o poche variazioni di flusso come nel distretto cerebrale o renale).

Quello che dal punto di vista degli scambi gassosi è importante è la **capacità di trasporto**. Questa, dal punto di vista della funzionalità cardiaco-circolatoria, è quella che abbiamo visto. C'è però un'altra variabile: la quantità di O_2 che può essere trasportato. Il trasportatore dell'O_2 è **l'emoglobina**. Il sistema cardiorespiratorio adegua flussi e pressioni, però la capacità di trasporto è funzione anche della quantità di emoglobina. Se ho un'alta quantità di emoglobina trasporto più O_2 a parità di lavoro cardiaco e circolatorio (ovviamente entro certi limiti: gli sportivi che fanno uso di EPO per aumentare la capacità di trasporto dell'O_2, aumentando questa modificano anche un altro parametro: la viscosità ematica. Incrementano quindi la pressione arteriosa, determinando un aumento del lavoro cardiaco e quindi delle condizioni, dal punto di vista del sistema circolatorio, molto sfavorevoli).

Il danno che viceversa io ho per un decremento dell'O_2 *(voleva dire emoglobina?Ndr)* è altissimo: se ho un'anemia a parità di lavoro cardiaco e adattamento cardiorespiratorio ho un trasporto di O_2 che è linearmente correlato alla quantità di emoglobina stessa (se ho 10 di emoglobina ho un valore X, se ho 15 ho X+1/2X, ma se ho 7 ho 25% in meno rispetto a 10, o il 50% in meno rispetto a 15)

La capacità di trasporto dell'O_2 è quindi altamente dipendente da una variabile che non avevamo considerato fino ad adesso: la quantità di emoglobina presente, quindi la quantità di globuli rossi presenti.

(Slide “Unità scambiatrice”)

Quindi si usa di solito considerare, dal punto di vista degli scambi e dell'ossigenazione dei tessuti, più variabili contemporaneamente:

- l'integrità dell'apparato respiratorio,

- l'integrità dell'apparato cardiaco e circolatorio

- capacità di trasporto *(dell'emoglobina immagino, Ndr)*.

C'è un'ultima variabile: la capacità dei tessuti di utilizzare l'O_2 che ricevono.

Nel considerare il problema della funzionalità respiratoria bisogna considerare che è integrata strettamente col sistema cardiocircolatorio e con la presenza di emoglobina.

Questa l'ho già descritta *(slide "Pressione transmurale"):* il circolo polmonare è ampiamente integrato nel sistema respiratorio e quindi quando ho un'attività respiratoria le variabili in gioco che devo sempre tener presenti sono:

- la **pressione di interstizio (pleurica)** che è differente tra apici e basi,

- la **pressione alveolare** che in condizioni di apnea è 0, mentre in condizioni di respiro va da -80 a + 100 nelle fasi inspiratorie ed espiratorie.

- Questo determina una variazione della **pressione in vena cava e nell'atrio di destra** che va da -2 nell'inspirio a +7 nell'espirio e una consensuale variazione di flussi polmonari e di riempimento del ventricolo di sinistra.

La risultante, che troverete nei testi di fisiologia e fisiopatologia, è la **pressione transmurale**, che è la differenziale tra la pressione all'interno del vaso e quella all'esterno del vaso. E' quella che si esercita sulla parete vascolare (cioè quella che si misura con un manicotto quando si misura la pressione arteriosa).

(Slide "Manovra di Valsalva" e "Manovra di Muller)

Vediamo due condizioni estreme che esemplificano gli aspetti fisiopatologici che sottostanno a molte delle condizioni che vedremo più avanti: c'è un modello facilmente riproducibile che mima quello che accade nelle condizioni in cui si ha un'alterazione dei flussi aerei.

MANOVRA DI VALSALVA

Se noi riempiamo la cassa toracica (ci troviamo cioè in una condizione di massimo riempimento aereo), determiniamo un'occlusione delle vie aeree (che possiamo fare facilmente perché queste terminano all'esterno a livello della cavità orale e delle fosse nasali) e cominciamo un'attività espiratoria, si ha un intrappolamento dell'aria:

- aumenta molto **la pressione intraalveolare**, in funzione della forza meccanica: comprimo senza poter espellere l'aria

- **diminuisce la negatività della pressione pleurica** (interstiziale), che da negativa tende a valori positivi

- la pressione che si esercita sul circolo polmonare dall'esterno supera la pressione di circolo

Il risultato è un ostacolo al flusso intrapolmonare, quindi al ritorno venoso. Si ha minore riempimento del cuore di sinistra: si riduce di conseguenza la gittata del cuore di sinistra stesso. Questa condizione, che si può verificare, se protratta determina essenzialmente una brusca riduzione della pressione arteriosa sistemica, quindi ipossia cerebrale, e quindi la sincope. Il risultato non si vedrà quindi tanto sul circolo polmonare, di cui non si ha una precisa percezione, ma sulla variazione brusca della pressione del circolo sistemico.

MANOVRA DI MULLER

Una condizione opposta che mima le condizioni di iperafflusso sanguigno in presenza di inalterate pressioni alveolari (o addirittura ridotte pressioni alveolari) è la manovra di Muller. E' sostanzialmente l'opposto: svuoto la cassa toracica; poi a glottide chiusa, quindi impedendo i flussi aerei, distendo la cassa toracica. Il risultato sarà un aumento dei volumi, uno stiramento dei vasi, quindi un aumento dei flussi per tendenziale riduzione delle pressioni, anche perché non avviene il riempimento alveolare. La pressione interstiziale (pleurica) diventa più negativa quindi ho le condizioni che favoriscono il ritorno venoso: aumenta quindi il riempimento del cuore di destra. Accade però un fenomeno che in parte spiega quello che può verificarsi in condizioni estreme (questa manovra è usata proprio per valutare la funzionalità cardiaca, più che quella respiratoria): il riempimento maggiore del cuore di destra determina un conflitto spaziale col cuore di sinistra. Il cuore di sinistra ha quindi capacità di riempimento minore in diastole (ricordate i meccanismi della funzionalità cardiaca dettati dal riempimento diastolico): si avrà una minore gittata del cuore di sinistra e un aumento delle pressioni del circolo venoso polmonare. Aumentando le pressioni sul circolo capillare *(polmonare)* per aumentato flusso e soprattutto perché c'è un minore deflusso (aumento della pressione nell'atrio e nel ventricolo di sinistra) si avrà tendenzialmente la possibilità di determinare un edema interstiziale polmonare.

Soprattutto la prima manovra (manovra di Valsalva) ma anche questa, mimano la gran parte dei fenomeni che accompagnano le alterazioni strutturali del polmone o del circolo nel determinare la

fisiopatologia di molte alterazioni degli scambi che si presentano nelle condizioni di malattia polmonare.

Queste *(non mi è chiaro a cosa si riferisca, Ndr)* sono le variazioni che determinano le variazioni di flusso in funzione dell'attività respiratoria.

Funzionalità del circolo polmonare

(Slide "Struttura Polmonare")

Un brevissimo accenno perché è molto importante: uno dei "dogmi" è il fatto che per avere una elevata funzionalità del circolo polmonare, le **pressioni del circolo arterioso polmonare devono essere molto basse**.

Ci dev'essere sempre cioè una bassa resistenza al flusso. Le pressioni all'interno del circolo polmonare arterioso sono inferiori ai 20 mmHg. Questo fa sì che il differenziale di pressione che si determina nel circolo capillare sia basso, ma sufficiente a determinare un flusso e quindi l'ossigenazione.

La presenza di basse pressioni sul versante arteriolare fa sì che sia mantenuto asciutto l'alveolo: non si supera mai la pressione oncotica, quindi non c'è mai uscita di liquido.

Non solo: le basse pressioni determinano le condizioni ottimali per una velocità di flusso nel circolo capillare che permetta l'ossigenazione.

Di solito gli scambi si completano già nel primo terzo del circolo capillare per quanto riguarda l'O_2; la diffusibilità della CO_2 è molto elevata, più di 20 volte quella dell'O_2, tuttavia il differenziale arterovenoso della CO_2 è più bassa per cui anche per questa l'equilibrio si raggiunge a circa un terzo del circolo.

Se si dovessero modificare le pressioni a monte, ma soprattutto a valle, si determinerebbero delle ampie variazioni della capacità di scambio a livello polmonare. Sarebbero infatti modificati i parametri dell'emodinamica e quindi si creerebbero le condizioni che non mantengono asciutto l'alveolo.

Quindi per avere un ottimo scambio devo avere un **setto molto sottile** costituito solo dalle cellule endoteliali, pochissimo tessuto interstiziale, e le cellule alveolari. Quando si determina uno stato flogistico o fenomeni di attivazione della fibrosi, la conseguenza immediata è l'alterazione della permeabilità ai gas del setto.

L'altro presupposto perché la meccanica respiratoria funzioni bene è che non si verifichi quanto esemplificato dalla manovra di Valsalva: **un'ostruzione delle vie aeree**. Perché questo non avvenga nella trachea e nei bronchi di grosso calibro c'è una struttura cartilaginea che permette la non compressibilità. Se io avessi una struttura comprimibile, durante l'espirazione avrei una compressione non solo sugli alveoli ma anche sulle strutture bronchiali: il risultato sarebbe un ostacolo al deflusso. Ci sono delle condizioni in cui processi flogistici alterano questa resistenza dei bronchi alla comprimibilità: è quello che accade nella bronchite cronica.

Oppure ci possono essere, a valle delle strutture cartilaginee, cioè nei bronchi di calibro più piccolo, dei fenomeni di alterazione strutturale o funzionale per cui questi si contraggono (c'è un'elevata capacità contrattile bronchiale che si manifesta perlopiù in condizioni patologiche). Ciò può determinare un'alterazione della velocità di flusso e dell'entità totale dei flussi aerei.

Infine le ultime caratteristiche sono l'elevata **comprimibilità** e l'elevata **ampiezza della superficie di scambio** a livello alveolare. La comprimibilità e la distensibilità sono funzione della struttura del setto; il numero di alveoli è la funzione determinante per quanto riguarda l'entità degli scambi aerei: tanto più ampia è la superficie di scambio, tanto migliore sarà l'entità degli scambi aerei.

Quindi le variabili che vedremo entrare in gioco nelle condizioni di alterata funzionalità respiratoria sono esattamente queste che vi ho elencato. Basta modificarne qualunque di queste e si determina una condizione di alterato scambio.

Lezione di Patologia generale e fisiopatologia clinica (sem2) del 3/4/2013 (1)

SBOBINA PATOLOGIA 03/04/2012

Prof. Minuz

Sbobinatore: Giorgia Romanò

Revisore: Serena Ammendola

Funzionalità della fisiologia respiratoria: Abbiamo visto che gli scambi avvengono perché c'è un gradiente pressorio con flussi costanti, soprattutto a basse pressioni nel circolo arteriolare polmonare, un passaggio attraverso il circolo capillare intra alveolare che porta alle venule post capillari e quindi anche alle vene polmonari con un gradiente di pressione basso però con pressioni costantemente inferiori ai 20 mmHg; (condizione che è necessaria per evitare che ci sia (registrazione troppo disturbata, N.d.R.) degli alveoli). C'è una superficie di scambio, quindi, che è determinata dall'entità della superficie alveolare. La condizione necessaria è che lo spessore del setto sia estremamente basso. Le vie aeree sono rese non comprimibili dalla presenza degli anelli cartilaginei, finché si arriva ai bronchioli terminali e agli alveoli dove la struttura è invece

fortemente comprimibile; tutto questo determina le caratteristiche intrinseche del parenchima polmonare, che ha un elevato grado di compliance, cioè di distensibilità, per cui può seguire senza eccessive variazioni di pressione i movimenti della cassa toracica ed è dotato di un ritorno elastico che favorisce, nella fase espiratoria, lo svuotamento alveolare. Un'alterazione di qualsiasi di queste componenti, della struttura alveolare, bronchiale e della struttura polmonare in generale determina una possibile alterazione che costituisce il profilo patologico per le condizioni di patologie polmonari che vedremo oggi.

Un altro aspetto fondamentale è che affinché avvengano gli scambi gassosi a livello polmonare deve esserci un certo rapporto tra perfusione polmonare e ventilazione polmonare. Nelle lezioni scorse abbiamo visto alcuni aspetti che regolano la perfusione polmonare: la quantità di sangue che giunge al circolo capillare intra alveolare, cioè quello che passa attraverso i setti interalveolari e quindi determina la possibilità di uno scambio gassoso, è fortemente condizionata dalla struttura e dai movimenti della cassa toracica e quindi dalla possibilità di determinare le variazioni della pressione transmurale, che favoriscono oppure ostacolano il passaggio del sangue. Nelle fasi inspiratorie c'è un aumento del ritorno venoso al cuore, una maggiore spinta del circolo in arteria polmonare e una condizione che per molti aspetti favorisce il circolo capillare intra alveolare. Nella fase espiratoria si ha un minore ritorno al cuore, c'è un certo ostacolo, anche se relativamente limitato, al circolo intra alveolare e comunque si determinano le condizioni che favoriscono un minor riempimento del circolo polmonare; comunque queste sono variazioni nell'ambito della fisiologia, che pesano poco nel condizionare gli scambi. Quello che di importante si osserva in condizioni fisiologiche è che la distribuzione dei flussi ematici, essendo in parte condizionata dalla pressione atmosferica e quindi dalla forza di gravità terrestre, tende a disporsi con un gradiente di flussi che dai valori bassi agli apici polmonari in stazione eretta va su valori di flusso più elevati verso le basi. La struttura della cassa toracica fa sì, però, che le condizioni di ventilazione non corrispondano – anzi tendano a essere quasi dissociate in modo completo – da quanto avviene per quello che riguarda i flussi ematici. In stazione eretta abbiamo maggior flusso ematico verso le basi polmonari, e in ogni condizione abbiamo verso gli apici una maggiore distensione del parenchima polmonare, un maggiore valore negativo di pressione degli interstizi (pressione pleurica) che determina una maggiore distensione alveolare verso gli apici, quindi un maggiore volume di aria che perfonde e raggiunge gli alveoli. Viceversa, verso le basi abbiamo una maggiore compressione alveolare, ma anche una maggiore capacità di espansione durante la fase espiratoria. Quindi la ventilazione può aumentare notevolmente verso le basi e, fisiologicamente, si determina una non precisa corrispondenza tra i diversi settori del polmone per quanto riguarda perfusione e ventilazione. Questo rapporto è sostanzialmente l'essenza degli scambi polmonari, che avvengono secondo un gradiente del rapporto tra perfusione e ventilazione che va da zero a infinito; avvengono in maniera ottimale quando questo rapporto è pari a 1. Per avere un buono scambio devo avere un'adeguata perfusione e un'adeguata ventilazione. Buona parte delle alterazioni nel processo di ossigenazione del sangue – e quindi di ossigenazione dei tessuti – avviene proprio in conseguenza di un alterato rapporto (mismatching) tra ventilazione e perfusione polmonare. Ci sono condizioni in cui la perfusione è ottimale ma la ventilazione è molto bassa: ad esempio in certe forme ostruttive delle patologie respiratorie. Oppure si può avere l'estremo opposto, condizioni in cui il flusso ematico è arrestato – quello che avviene nell'embolia polmonare – ma la ventilazione viene mantenuta. Abbiamo quindi due estremi nel campo della fisiopatologia respiratoria, e un valore ottimale di 1 che già in condizioni fisiologiche, tornando a questa rappresentazione dei flussi ematici e dei flussi aerei e dei volumi nelle diverse porzioni del polmone, appare evidente come sia difficile da raggiungere. Avremo sempre un'adeguata ossigenazione che può avere, però, una certa quota di non adeguatezza anche in condizioni fisiologiche.

Guardiamo ora l'apparato respiratorio dal punto di vista della ventilazione, cioè come l'aria arrivi agli alveoli. (riferendosi alla slide) Queste onde di minore ampiezza sono il volume corrente, cioè l'entità degli scambi aerei per ogni atto respiratorio che sono limitati, è un'attività limitata dal punto di vista fisico. Il fabbisogno di ossigeno per i tessuti è sufficientemente mantenuto da uno scambio di volumi aerei inferiore al litro. Se si moltiplica questo per gli atti respiratori, si avrà che in un minuto viene scambiato, in realtà, un volume che è superiore ai 5 litri. Si può ampliare la capacità di scambio attraverso un respiro molto profondo. Si determina un limite a questa attività respiratoria che è dato dalle caratteristiche intrinseche della cassa toracica e della struttura parenchimale polmonare. Un'elevata compliance permette un'elevata distensione del parenchima polmonare: questo favorisce il reclutamento alveolare e l'ampliamento della superficie dei volumi alveolari; permette anche, per molti aspetti, un migliore afflusso ematico e quindi si determinano le condizioni attraverso le quali aumentare gli scambi aerei. Questo incremento di volume che può essere dato da una massimale attività espiratoria è la capacità espiratoria massimale, che può essere accompagnata da un'elevata ventilazione attraverso una massimale attività espiratoria. Questo è il volume di riserva inspiratorio e questo il volume di riserva espiratorio (riferendosi ancora alla slide). È importante per comprendere quello che avviene in alcune condizioni, come le broncopatie ostruttive ma anche nelle forme restrittive. C'è una quota di aria che non è mobilizzabile, che rappresenta il volume residuo, e vedremo come in molte condizioni, specialmente nelle forme ostruttive, questo aumento del volume residuo sposti tutta l'attività respiratoria verso volumi più elevati e con una minore capacità di riserva inspiratoria ed espiratoria. Un altro requisito fondamentale per un'adeguata attività ventilatoria – oltre ad avere dei volumi polmonari adeguati e quindi una capacità di contenere aria – è anche quello di determinare dei flussi aerei attraverso passaggio di aria contro basse resistenze; infatti per i flussi aerei valgono le stesse leggi fisiche dell'idrodinamica che abbiamo già visto per la regolazione dei flussi nel circolo sanguigno. La quantità di ventilazione che si può ottenere è proporzionale alla variazione di pressione che si determina attraverso il movimento della cassa toracica, ed è inversamente proporzionale alle resistenze al flusso. Le resistenze al flusso sono proporzionali in modo inverso al diametro delle vie aeree; quindi se si ha una condizione per la quale c'è un ostacolo meccanico determinato da un minor diametro bronchiale, si avrà un aumento della resistenza al flusso. In condizioni fisiologiche, le strutture aeree che portano l'aria agli alveoli, soprattutto quelle di calibro maggiore, sono quelle che determinano il maggior grado di resistenza. Le resistenze sono comunque basse, e si hanno perché c'è una diramazione bronchiale che va rimpicciolendosi e quindi si determina una resistenza al flusso. Si avrà anche una progressiva riduzione della velocità di flusso, secondo le stesse regole già viste per la circolazione sanguigna. In condizioni patologiche, invece, si determina che l'ostacolo al flusso, cioè l'aumento delle resistenze, avviene nelle porzioni più distali, più periferiche dell'albero bronchiale. Quindi in condizioni fisiologiche i flussi aerei sono favoriti e determinati dalle variazioni di pressione, quindi dall'attività della cassa toracica, e sono minimamente ostacolati dalle resistenze, soprattutto nella fase espiratoria, in cui si passa dai calibri più piccoli a quelli più grossi dei bronchi, in cui in condizioni fisiologiche si dovrebbe avere il minor ostacolo possibile. Tuttavia ci sono delle condizioni nelle quali l'ostacolo e la resistenza al flusso diventano manifesti: infatti in molte patologie l'ostacolo è più in periferia che nelle grosse vie aeree. Nella Manovra di Valsalva si determina un ostacolo alla fuoriuscita dell'aria, occludendo le vie aeree al livello della bocca e del naso. In questo caso avrete un forte variazione dei flussi, perché non potete determinare un flusso d'uscita. In una condizione più frequente, quando l'ostacolo è più periferico, si determinano dei volumi di scambio aereo ridotti su tempi più lunghi. Questo perché, secondo la legge vista prima, se voi avete un minor calibro bronchiale, avrete un minor flusso (il flusso è direttamente proporzionale al raggio) e allo stesso tempo avrete anche una variazione di pressione verso il basso maggiore perché il calibro del bronco in questo caso si riduce; si determina che avrete minori volumi e minore flusso per unità di tempo: la variazione di volume, quello che determina i flussi aerei, si riduce. Quindi guardando alla classica presentazione (si riferisce alla slide, N.d.R.) come anelli flusso/volume che sicuramente avrete visto in fisiologia, per cui l'attività espiratoria è questa

(probabilmente più ampliata), si vede che si va verso volumi maggiori e poi c'è la fase espiratoria in cui si ha una prima uscita dell'aria molto rapida e poi si ha una fase più tardiva, in cui si mobilizzano minori volumi con tempi più lunghi.

PATOLOGIE OSTRUTTIVE

Ma in condizioni di ostacolo al flusso si avrà, a parità di volumi totali, una minore capacità di fare entrare aria, e questo perché c'è un ostacolo all'uscita che è particolarmente evidente, facilmente misurabile, che è determinato dal fatto che per unità di tempo i flussi aerei tendono a ridursi e quindi la capacità di svuotamento degli alveoli è minore. Quali sono le condizioni che determinano questo stato di ridotta variazione dei flussi? La condizione più paradigmatica è **l'asma bronchiale**, un processo flogistico bronchiale spesso innescato su una risposta ad antigeni che determinano una risposta di tipo allergico. Il processo flogistico immunoallergico, nelle forme cosiddette dell'asma estrinseco, è determinato molto frequentemente da allergeni inalatori, cioè sostanze che attraverso le vie aeree giungono a contatto con la mucosa e causano, appunto, una risposta di tipo allergico. In queste condizioni si liberano molti mediatori, che sono in grado di determinare una costrizione della muscolatura liscia bronchiale: istamina, leucotrieni, trombossano e altri; questo insieme di mediatori determina una risposta contrattile che può essere a rapida insorgenza e temporalmente limitata, quindi il fenomeno ha un certo grado di reversibilità nelle fasi iniziali della malattia, e un certo grado di restringimento (cronico, immagino N.d.R.) si determina negli stadi più avanzati . Si determina una variazione del volume dei bronchi, soprattutto e ovviamente nelle porzioni più distali dell'albero bronchiale. In queste condizioni si determina che l'attività inspiratoria, cioè l'attività della muscolatura scheletrica che è implicata nella respirazione, richiede un'aggiunta di lavoro, perché avremo un maggior ostacolo al flusso e quindi, per ottenere un'adeguata distensione degli alveoli, avrò bisogno di un maggiore contributo muscolare. Pensate alla dinamica del riempimento alveolare, dal punto di vista della fisiologia: noi abbiamo una fase di espansione in cui si determina il flusso aereo e poi la distensione serve a mantenere i volumi; quindi c'è una fase dinamica e una fase statica, e io ho bisogno di entrambe. In questa condizione (di asma bronchiale, N.d.R.) ho difficoltà nella fase dinamica, nel determinare un flusso d'entrata, ma una volta raggiunto il riempimento alveolare la fase statica non è sostanzialmente modificata, non c'è una patologia dell'alveolo, non c'è una grande alterazione della compliance polmonare; però ho difficoltà nel determinare i flussi aerei in entrata e quindi li riesco a ottenere attraverso un aumento dell'attività respiratoria. A questo punto i volumi sono stati raggiunti: nella fase di apnea non ho sostanziali modificazioni rispetto alla condizione fisiologica, ma nella fase espulsiva avviene il fenomeno dell'intrappolamento dell'aria. Accade (fisiologicamente N.d.R) che nella fase espiratoria avete un minore contributo muscolare ai movimenti della cassa toracica perché il ritorno elastico polmonare in molti casi è sufficiente. Il collassamento della cassa toracica, anche passivo, determina uno svuotamento che avviene contro basse resistenze al flusso. In questo caso, invece, le alte resistenze al flusso determinano un ostacolo per lo svuotamento della cassa toracica. I flussi in uscita sono ridotti e rallentati, e aumenta la pressione intra alveolare: è quello che avete già visto accadere nella manovra di Valsalva, dove però l'ostacolo è molto distale. Qui invece l'ostacolo è prossimale agli alveoli! La pressione intra alveolare aumenta molto, e c'è viceversa una minore pressione a livello delle strutture bronchiali, che tendono piuttosto a collabire, spinte dalla duplice forza: la forza dell'interstizio (la pressione dell'interstizio determinata dalla pressione pleurica che diventa positiva nella fase espulsiva) e la pressione intra alveolare: questo ostacola ulteriormente l'uscita. In una condizione di questo tipo si avrà anche una pressione transmurale sul circolo intra polmonare che diventa apprezzabile. Il circolo che porta sangue agli alveoli, cioè porta sangue per gli scambi alveolari, subisce una pressione transmurale più elevata (perché avete pressione alveolare e pressione dell' interstizio convergenti e aumentate) e quindi si determina un minore flusso ematico. Questo determinerà un'alterazione del rapporto ventilazione/perfusione, ma soprattutto determinerà una minore capacità di ossigenazione dei tessuti. In termini puramente emodinamici, un ostacolo al

flusso intra alveolare e intra polmonare – perché la pressione della cassa toracica si esercita su tutte le strutture vascolari – determinerà un aumento delle pressioni nel cuore di destra e nell' arteria polmonare, ma una bassa pressione e bassi flussi nel circolo venoso polmonare e minore riempimento del ventricolo sinistro. Quindi quello che si determina è una condizione che è caratterizzata essenzialmente da alte pressioni alveolari, ridotti flussi in uscita, prolungamento della fase espiratoria, minore flusso ematico nel circolo intra alveolare, aumento della resistenza al flusso ematico, minore riempimento del cuore di sinistra, riduzione della gettata del cuore di sinistra.

Una condizione analoga, però con un aspetto di alterazione strutturale molto più importante, è quella che si determina nella **broncopatia cronico ostruttiva (BPCO)**, spesso definita come bronchite cronica: è una patologia tipica dei fumatori, di chi viene esposto a polveri e a certe sostanze come i lavoratori nell'industria del carbone o della silice, nei quali si determina un accumulo di polveri con una componente flogistica infiammatoria a livello dei setti, a livello dei bronchi e un rimodellamento dell'interstizio, un rimodellamento dello spessore della struttura bronchiale con fenomeni anche di spasmo bronchiale. È una condizione, quindi, che determina un ostacolo ai flussi aerei più persistente, che si protrae nel tempo, accompagnata spesso da un ostacolo meccanico dato dal fatto che aumenta la componente secretiva a livello dell'epitelio bronchiale: si ha quindi una maggiore produzione di muco e questo stesso determina un ostacolo ai flussi aerei. In questa condizione, quello che abbiamo visto esemplificato dalla crisi di broncospasmo nell'asma bronchiale si mantiene nel tempo. Avete un ostacolo nella fase inspiratoria e un notevole ostacolo nella fase espiratoria; l'ostacolo nella **fase inspiratoria** è determinato dal fatto che c'è una minore capacità di riempimento alveolare, perché i flussi aerei sono ostacolati, ma questa volta avete una seconda componente, di tipo strutturale, perché la compliance polmonare tende a ridursi. Il raggiungimento dei volumi aerei è possibile, i volumi cosiddetti statici non vengono sostanzialmente compromessi, quindi la capacità polmonare totale non viene ridotta. Nella **fase espulsiva** avrete una componente di ostacolo al flusso, determinata da alte resistenze al flusso e dall'elevata pressione che si determina a livello alveolare, per cui il ritorno elastico del polmone viene in parte ridotto. In realtà il ritorno elastico del polmone viene mantenuto, ma avviene il fenomeno dell'intrappolamento dell'aria, per cui lo svuotamento alveolare richiede una maggiore forza. È necessario usare i muscoli respiratori anche nella fase espiratoria, la stessa cosa che accadeva nell'asma bronchiale. Nell'asma bronchiale e nella bronchite cronica lo scambio aereo su volumi correnti è possibile. La capacità di ossigenazione viene in parte ridotta: vedremo il problema degli scambi gassosi, dell'ossigenazione e della dispersione dell'anidride carbonica in un secondo momento, per ora guardiamo il fenomeno dal punto di vista dei flussi aerei. I volumi correnti vengono mantenuti, può esserci una certa quota di aumento dell'attività respiratoria che è spinta (anche questo lo vedremo più avanti) dall'ipossia che si determina in periferia, per cui aumenta la frequenza respiratoria: però aumenta entro certi limiti! Perché se aumentate la velocità di riempimento e svuotamento alveolare, mobilizzate sostanzialmente dei volumi minori per ogni singolo atto respiratorio; inoltre, l'aumento dei tempi di espirazione di per sé determina una necessità di atti respiratori più protratti. Quindi saranno tendenzialmente più ampi e con un allungamento della fase espiratoria. Dal punto di vista della meccanica respiratoria, l'allungamento della fase espiratoria è di aiuto perché permette uno svuotamento più graduale. Infatti se voi avete un brusco incremento della pressione attraverso una rapida contrazione dei muscoli respiratori in un soggetto che presenta un fenomeno ostruttivo, quello che si determina è che l'ostacolo al flusso non viene ridotto, la movimentazione dell'aria non viene aumentata; la movimentazione dell'aria è favorita piuttosto da una contrazione più lenta della cassa toracica, e questo perché un'elevata contrazione improvvisa determina fenomeni di compressione delle vie aeree. Come sapete dalla fisiologia, nella fase espiratoria si determinano un incremento della pressione intraalveolare e un flusso in uscita: questi due elementi determinano il mantenimento di un flusso nelle strutture bronchiali più periferiche perché c'è una pressione interna che è positiva e contrasta la pressione dell'interstizio: il bilancio è comunque positivo, e l'alveolo non collassa. Se invece si ha una

condizione di forte ostacolo al flusso, con elevati volumi intraalveolari ma poco flusso nei bronchi, una brusca contrazione dei muscoli respiratori determinerebbe un'ulteriore riduzione del lume bronchiale, perché si ha un effetto di compressione dall'esterno senza una pressione positiva adeguata all'interno: gli alveoli restano distesi e le strutture a monte vengono invece compresse. Quindi una delle caratteristiche del soggetto con bpco è che diventa partecipe dei meccanismi adattativi attraverso la propria attività respiratoria: tende a favorire la pervietà dei bronchi attraverso una parziale ostruzione determinata dalla chiusura delle labbra per cui l'espirio è protratto, a labbra chiuse, e questo determina una pressione maggiore nelle vie aeree che permette di mantenere i bronchi pervi. È un adattamento funzionale che il soggetto con una bronchite cronica ostruttiva tende ad assumere in modo spontaneo: egli stesso percepisce l'evidenza che un'attività respiratoria più intensa non porta a giovamento; quello che il soggetto realizza è ovviamente un atto volontario: essenzialmente, quello che si determina è un adattamento di tipo comportamentale. Dicevamo che abbiamo una condizione di ostacolo ai flussi, un'alterazione strutturale – quindi una complessa alterazione – che determina difficoltà nell'espiro: si determina dunque la necessità di utilizzare i muscoli accessori della respirazione, e questo determina un maggior lavoro muscolare e anche un certo grado di ipertrofia della muscolatura respiratoria compresa la muscolatura accessoria. Si determina inoltre una fase espiratoria in cui il ritorno elastico del polmone strutturalmente sarebbe mantenuto ma dal punto di vista dinamico è contrastato dal fatto che c'è una maggiore pressione nella fase espulsiva per l'intrappolamento dell'aria negli alveoli. Quindi durante la fase espulsiva si sviluppano delle pressioni intra alveolari molto più elevate con un gradiente di pressione alveolo-bronchiale molto elevato. E quindi il rallentamento della fase espulsiva favorisce il mantenimento dei flussi senza determinare una compressione dall'esterno sulle vie aeree. Una condizione di questo tipo, per cui i volumi polmonari sono mantenuti ma c'è un ostacolo alla fase espulsiva, può determinare il **fenomeno del danno dei setti alveolari,** a causa dall'elevata pressione che si determina a livello alveolare; ovviamente non è il solo meccanismo: siamo in presenza di un processo flogistico quindi ci sono le attività di metalloproteasi, rimodellamenti strutturali, attività di enzimi, danno ossidativo che portano a un progressivo danneggiamento delle strutture polmonari, soprattutto a livello alveolare. Ma quello che accade, e che è fortemente determinato dallo sviluppo di elevate pressioni all'interno degli alveoli, è che si ha progressiva rottura dei setti alveolari per cui gli alveoli tendono a fondersi tra di loro. Questa è una tipica complicazione della bronchite cronica ostruttiva, l'enfisema polmonare ostruttivo, in cui la componente fisiopatologica di notevole importanza è determinata dall'elevata pressione che si sviluppa negli alveoli (pressione positiva) durante la fase espiratoria. Normalmente, a volumi correnti, le variazioni di pressione intraalveolare sono molto limitate: si parla di valori abbondantemente sotto i 10 mmHg, mentre in condizione di espirio forzato le pressioni intra alveolari possono salire fino a valori, in centimetri d'acqua, di 40 cmH_2O. In una condizione di questo tipo, soprattutto nelle fasi più avanzate della malattia, in presenza di elevata ostruzione al flusso aereo, si può arrivare fino a valori di 100 cmH_2O. La stessa cosa accade anche durante tosse intensa in cui si ha una brusca contrazione della cassa toracica: la pressione intraalveolare sale fino a valori che sono più di dieci volte quelli che si determinano fisiologicamente a volumi correnti. Quindi è una condizione di elevata pressione intraalveolare, la fase espiratoria, che determina, in associazione al processo flogistico, la rottura dei setti. La rottura dei setti ha una conseguenza importante perché determina una riduzione delle superfici di scambio: quindi una condizione di questo tipo determina una minore capacità di scambiare ossigeno a parità di volumi. Quello che viene modificato, sostanzialmente, è il rapporto ventilazione/perfusione: vengono modificati, complessivamente, sia la superficie perfusa sia la superficie alveolare che è esposta agli scambi aerei; quindi questo determina un ulteriore peggioramento della capacità di scambio aereo. I **volumi totali statici non sono ridotti**, la quantità di aria che entra nel polmone non è ridotta, ma anzi tende spesso ad essere aumentata. I **volumi dinamici** ovviamente sono **ridotti** con minori flussi in entrata e i volumi in uscita sono rallentati e distribuiti in un tempo più lungo. Abbiamo quindi una fase espulsiva che dura più della fase inspiratoria, quando normalmente in fisiologia accade il contrario. In una condizione di questo tipo si svilupperà una **pressione**

intratoracica molto elevata perché nella fase espiratoria si avrà una pressione pleurica positiva e una pressione alveolare molto elevata, e quindi i flussi di sangue intra alveolari tenderanno ad essere ostacolati. C'è poca ossigenazione, e questo determina fenomeni di vasospasmo. In queste condizioni (nella bronchite cronica, nell'enfisema ostruttivo…) si determinano le condizioni necessarie perché si sviluppi un aumento progressivo delle resistenze al flusso ematico nel circolo polmonare, per cui aumenta la pressione in arteria polmonare. Vedremo che l'aumento della pressione in arteria polmonare è una delle cause principali dello sviluppo del cosiddetto "cuore polmonare", che è la condizione di insufficienza del cuore di destra. Quindi abbiamo visto diverse condizioni patologiche. Nell'**asma bronchiale** c'è una condizione reversibile – per lo meno all'inizio – di contrazione della muscolatura liscia bronchiale, con un ostacolo al flusso che determina una difficoltà nella fase di riempimento: i flussi in entrata sono ostacolati per un aumento delle resistenze più distali rispetto alle vie aeree, cosa che non avviene in fisiologia, però questa variazione di flusso può essere sopperita dall'aumento della forza esercitata durante la fase inspiratoria. I volumi statici sono conservati e in espirazione si verifica il fenomeno dell'intrappolamento dell'aria per cui aumenta la pressione, molto di più di quanto non avvenga fisiologicamente, a livello degli alveoli e questo è espressione di una difficoltà nello svuotamento; determina anche ulteriori difficoltà perché sono tendenzialmente compresse le vie aeree dove non c'è struttura cartilaginea. Nella **bronchite cronica** avviene la stessa cosa, ma la differenza è che il fenomeno si sviluppa nel tempo ed è un **fenomeno irreversibile**: avviene infatti un rimodellamento strutturale della mucosa, dell'interstizio, dell'alveolo, che tende a dare una stabilità al fenomeno e quindi una maggiore progressività. Il fenomeno dell'intrappolamento dell'aria è responsabile delle alterazioni degli scambi aerei, dei fenomeni di vasocostrizione nel circolo polmonare ma anche di per sé di un ostacolo al flusso circolatorio polmonare per cui aumenta la pressione nel tempo a livello dell'arteria polmonare.Quindi gli aspetti caratteristici della patologia polmonare ostruttiva sono esemplificati da questo maggior ostacolo all'espirio, da tutti i processi flogistici di rimodellamento strutturale e dal cronico ostacolo del flusso dell'aria, per cui si determina una condizione per la quale sono fortemente ostacolati gli scambi gassosi a livello alveolocapillare: questo determina ipossiemia. Allo stesso tempo determina ipertensione polmonare e quindi, vedremo, lo sviluppo di un "cuore polmonare" con scompenso cronico del cuore di destra. Nelle patologie di tipo ostruttivo abbiamo variazioni dei volumi cosiddetti dinamici e in queste condizioni si sviluppano poi delle secondarie alterazioni del circolo intrapolmonare per cui si determina una condizione che favorisce lo scompenso del cuore destro. La ridotta ossigenazione è causa poi della sofferenza tissutale (determinata dall'ipossia tissutale) che è un aspetto comune a tutte le forme di patologia respiratoria.

PATOLOGIE RESTRITTIVE

Se l'aspetto caratteristico delle forme ostruttive è la variazione dei volumi dinamici, la variazione di volumi statici, cioè la capacità di riempire, distendere il polmone, di avere un adeguato volume aereo nei polmoni è la caratteristica delle forme cosiddette restrittive. Il termine "restrittivo" indica proprio la variazione del volume statico. La causa più ovvia è questa: se ho un basso volume aereo perché ho un basso riempimento polmonare, allora ho necessariamente una condizione di tipo restrittivo. Questa condizione può avere genesi molteplici! Pensiamo a un soggetto affetto da grave obesità: subisce una compressione verso il diaframma dalla pressione intraaddominale, ha una limitata escursione della cassa toracica perché ha un ostacolo meccanico all'attività respiratoria, si determinerà una variazione di volume, durante gli atti respiratori, molto limitata. Non solo, ma anche in condizioni di riposo i volumi polmonari saranno ridotti. Un soggetto di questo tipo non trova nessun ostacolo al flusso, non ci sono variazioni delle resistenze; i flussi aerei, quando avvengono, avvengono su volumi ridotti, ma senza che ci sia un aumento della resistenza al flusso. <u>Quindi quello che caratterizza la forma restrittiva da quella ostruttiva è che la fase di statica dei volumi è alterata ma non trovo variazioni della fase dinamica, cioè non c'è un ostacolo al flusso,</u>

non c’è un aumento delle resistenze ai flussi aerei. Le forme restrittive però hanno una genesi estremamente variegata e possono dipendere da meccanismi integralmente extrapolmonari. Un tipico esempio sono le patologie respiratorie da deficit di ventilazione dovute a deficit della muscolatura. Questo deficit muscolare può essere causato da:

- un’alterazione nella risposta contrattile perché c’è un deficit di segnale, e quindi parliamo di una paralisi muscolare dovuta a un evento ischemico, a un danno degenerativo dell’innervazione della muscolatura scheletrica;
- un deficit muscolare come nelle malattie da distrofia muscolare che determinano un deficit della meccanica respiratoria perché manca proprio la forza contrattile.
- Oppure possono esserci altri meccanismi: se c’è una variazione del terzo spazio, per cui le cavità pleuriche si riempiono di liquido, come può avvenire nelle pleuriti, si ha una compressione dall’esterno della struttura polmonare che quindi risulta impedita nella sua espansione; la cassa toracica si muove adeguatamente ma non si ha riempimento alveolare perché c’è una variazione della pressione pleurica, che è sempre positiva perché c’è una raccolta di liquido.
- Un’altra condizione *(che porta a patologia restrittiva, N.d.R.)* è un trauma con entrata di aria nel cavo pleurico: si determina allora la condizione di pneumotorace, dove si riscontra una brusca variazione della pressione dell’interstizio. La pressione che si determina a livello delle pleure determina la possibilità di espandere il polmone perché questo viene mantenuto aderente alla cassa toracica: ma qualora entri aria nel cavo pleurico la pressione dell’interstizio, la pressione pleurica, diventa improvvisamente positiva e si ha la retrazione del parenchima polmonare data dal ritorno elastico polmonare e quindi un collasso polmonare, che impedisce la distensione in risposta all’attività respiratoria. Oppure ci possono essere neoplasie che si sviluppano al di fuori o dentro il polmone. Oppure potete avere un processo infiammatorio degli alveoli: in questo caso siamo ovviamente nell’ambito delle patologie che sono tipiche del polmone.

Però avete visto come molte condizioni che non riguardano strettamente il parenchima polmonare possano determinare una restrizione, una riduzione dei volumi contenuti nel polmone. Se ho una condizione di ipoventilazione avrò sostanzialmente che i volumi correnti possono anche essere mantenuti però avrò difficoltà nell’ampliare in risposta a necessità i volumi: quindi i volumi di riserva inspiratorio ed espiratorio tendono a ridursi. Se si riducono entrambi e non ho fenomeni di ostacolo ai flussi aerei tendenzialmente ho una complessiva diminuzione dei volumi polmonari, cioè la capacità polmonare totale tende ad essere ridotta. In una condizione di questo tipo ho comunque una riduzione della possibilità di scambiare i gas, e quindi tendenzialmente avrò una minore possibilità di ossigenare il sangue ed eliminare anidride carbonica. Tenete ben presente che una condizione di bassa ventilazione per meccanismi extrapolmonari necessariamente determina ipossia e ipercapnia; ipossia vuol dire anche vasocostrizione del circolo polmonare e quindi aumento delle resistenze al flusso ematico. Le cause polmonari di forme restrittive sono estremamente comuni e spesso sono reversibili: un esempio è la **polmonite**, un processo infiammatorio a livello dei bronchioli con coinvolgimento alveolare che determinano una flogosi alveolare per cui gli alveoli sono riempiti di essudato e sono ricchi di cellule infiammatorie: questo determina l’impossibilità che gli alveoli siano ventilati, che possa entrare aria; la stessa cosa accade in una condizione che abbiamo già visto, che è **l’edema polmonare**, a genesi cardiaca, dove l’alveolo è occupato da trasudato dovuto al fatto che aumenta la pressione idrostatica a livello del circolo capillare polmonare. Una condizione di basso riempimento alveolare si può determinare anche quando ci sia un completo ostacolo meccanico al flusso aereo in un settore bronchiale (se avviene in un bronco di grosso calibro ovviamente sono coinvolti anche tutti i bronchi più piccoli)

ad esempio anche per la presenza di muco nel lume bronchiale: questo determina una condizione di atelettasia cioè non si ha un riempimento alveolare. **Neoplasie polmonari** possono occupare spazio all'interno del parenchima e quindi distruggere la struttura polmonare; sono tutte situazioni in cui si determina una variazione complessiva dei volumi aerei ma la capacità di movimentare l'aria in sé è mantenuta (a differenza delle forme da causa extratoracica) e questo è importante perché la variazione degli scambi tende ad essere differente da quella che avete visto nelle forme extrapolmonari, perché se non ci sono ostacoli al flusso e alterazioni strutturali del parenchima, allora la capacità di scambiare gas, anche se ridotta, può essere mantenuta: questo è importante perché essendo l'anidride carbonica molto più diffusibile dell'ossigeno, in queste condizioni si sviluppa una tendenziale ipossemia ma l'ipercapnia tende ad essere meno evidente, perché aumenta l'attività respiratoria. L'aspetto caratteristico è comunque la diminuzione dei volumi complessivi, la riduzione della superficie di scambio e l'ipossia che si accompagna più tardivamente (e vedremo per quale motivo) all'ipercapnia. Ancora una volta si ha aumento della resistenza al flusso e lo sviluppo di ipertensione polmonare. Anche nelle forme respiratorie di tipo restrittivo un'ipossia tissutale determina lo stimolo per un aumento dell'attività respiratoria: tendenzialmente aumenta il lavoro muscolare! Se avete una polmonite l'attività respiratoria diventa più intensa, cioè il numero di atti respiratori potrà essere più alto, esattamente come quando state compiendo uno sforzo fisico: questo permette di "scambiare", anche se in misura ridotta, e rappresenta quindi un adeguamento funzionale. Nelle forme extrarespiratorie questo adeguamento funzionale spesso può mancare: se c'è un deficit neurologico o un deficit muscolare (come nelle paresi o nelle distrofie muscolari) l'attività respiratoria tende ad essere comunque ridotta, perché non c'è possibilità di adattamento funzionale. In molte forme restrittive, ad esempio nella polmonite, il fenomeno tende ad avere un certo grado di reversibilità: il processo acuto si risolve, con o senza intervento antibiotico, e si ha la restituzione del parenchima polmonare alla situazione preesistente. Ci sono invece condizioni in cui i processi infiammatori portano a fibrosi polmonare, cioè un ispessimento dell'interstizio, una ristrutturazione del parenchima polmonare che diventa appunto fibroso, la struttura alveolare viene fortemente ridotta perché il setto alveolare aumenta di spessore… In queste condizioni i volumi tendono a ridursi, così come gli scambi, e il processo diventa
irreversibile.

<u>Come si comportano la ventilazione e i volumi dinamici nelle forme ostruttive e restrittive:</u>

<u>Patologie ostruttive</u>: i volumi correnti possono essere mantenuti però avvengono con attività respiratoria più faticosa; può esserci una dispnea, il lavoro muscolare incrementa. Quello che accade è che se parte dell'aria viene intrappolata io avrò uno spostamento di tutta l'attività respiratoria verso volumi più elevati, cioè si ridurrà la capacità di riserva respiratoria: riuscirò a far entrare aria ma avrò difficoltà a farla uscire, tenderà quindi ad aumentare quello che è definito volume residuo, e tutta l'attività respiratoria si sposta verso volumi più elevati con la capacità di movimentazione che tende ad essere ridotta. I volumi statici non sono complessivamente ridotti, ma anzi la capacità polmonare totale nelle forme ostruttive tende ad essere più elevata di quanto non sia in condizioni fisiologiche; però la capacità ventilatoria, cioè questa variazione di volume, avviene in tempi più lunghi e su volumi, soprattutto nella fase espiratoria, ridotti. Quindi tutta l'attività respiratoria si sposta verso volumi più elevati con un volume residuo più ampio.

<u>Forme restrittive</u>: i volumi correnti sono mantenuti fino a che non si arriva a fasi più avanzate. Quello che cambia è la capacità di ventilare, nelle forme extrapolmonari, quindi la capacità di avere un volume di riserva inspiratorio ed espiratorio. I volumi complessivamente tendono a ridursi, perché non aumenta il volume residuo! Quindi la capacità polmonare totale tende ad essere più bassa. Respiro facendo entrare meno aria e facendone uscire meno, senza aumento di volume residuo: questo è tipico, ad esempio, delle forme da deficit muscolare; i volumi correnti possono poi, col tempo, ridursi gradualmente, ma quello che appare evidente è che la capacità di riserva

funzionale respiratoria tende a ridursi, per riduzione sia dei volumi in entrata che di quelli in uscita. La stessa cosa se ho una massa che occupa il parenchima polmonare, una polmonite o liquido… ho volumi correnti che possono essere mantenuti ma l'aria che entra complessivamente – nonostante l'apertura della cassa toracica – è minore perché lo spazio è occupato, e quindi i volumi in entrata e in uscita si riducono mentre i volumi residui non tendono ad aumentare. Ancora una volta avrò una riduzione della capacità polmonari totali. *(slide volumi dinamici polmonari)* Allora se io ho un atto respiratorio entra l'aria, l'entrata dell'aria è progressiva (la curva tende ad essere piuttosto piatta, anche se dovrebbe essere un po' più ampia *(riferendosi alla slide, N.d.R.)*) e poi avviene l'espirazione, con il 75 percento dell'aria che esce subito, poi i volumi si riducono fino a che non si ritorna al minimo volume di aria. Nelle forme ostruttive potrò mantenere i volumi d'entrata incrementando la forza della respirazione, attivando i muscoli respiratori accessori (anche se tendenzialmente si riducono), e la quantità di aria che esce nel primo secondo è molto più bassa. In una respirazione forzata dimostro facilmente una riduzione dei volumi in uscita; la ripetibilità di questo dato fa sì che il monitoraggio delle forme ostruttive avvenga tramite la misurazione dei flussi in uscita nell'unità di tempo, che in questo caso è il secondo: stiamo parlando della fev1, espressione dell'ostacolo dei flussi aerei in uscita. È estremamente ripetibile, perché l'espirazione forzata determina la condizioni che mettono meglio in evidenza l'ostacolo ai flussi. E quindi dove esista una condizione di questo tipo avrò bassi flussi con ritardo nell'uscita. Tanto più è allungata la fase espiratoria, tanto più è evidente che l'ostacolo avviene nei flussi più periferici, che l'aria viene movimentata più tardivamente: cioè prima faccio uscire l'aria dai bronchi, poi dai bronchioli ecc… l'allungamento dell'attività respiratoria in uscita è espressione dell'ostacolo, della resistenza al flusso.

Attività respiratoria e funzione cardiovascolare

L'attività respiratoria è funzionale agli scambi gassosi, quindi una condizione di ostacolo al flusso o di bassa ventilazione determina minor scambio gassoso e quindi minore capacità di assumere ossigeno e in una certa misura, vedremo, un ostacolo anche all'eliminazione dell'anidride carbonica. Una patologia di questo tipo condiziona anche la capacità di determinare dei flussi ematici polmonari adeguati. Quindi c'è una duplice ripercussione di una patologia di tipo ostruttivo o restrittivo: la prima è una diretta modificazione degli scambi gassosi, la seconda è una modificazione indiretta degli scambi gassosi perché modifica anche i flussi ematici nel polmone. Questo ha anche ripercussioni sulla funzionalità cardiaca, quindi sul trasporto di ossigeno, che è dato, oltre che dalla quantità di emoglobina, dalle caratteristiche del circolo e dalla funzionalità cardiaca. Ci sono ripercussioni in buona parte anche sulla diffusione ai tessuti. Abbiamo già visto che la funzionalità cardiaca ha importanti ripercussioni sull'ossigenazione dei tessuti. Vediamo ora quello che si determina in termini di funzionalità cardiaca nelle condizioni di alterazione polmonare e poi vediamo tutto in termini di scambi gassosi e di trasporto di ossigeno. **Ogni patologia polmonare, sia di tipo ostruttivo che di tipo restrittivo, determina a lungo andare una condizione di insufficienza del cuore di destra, condizione tutt'altro che rara quando parliamo di patologia respiratoria!** È una delle cause più comuni dello scompenso cardiaco anche se si differenzia in parte da quello che abbiamo visto nelle lezioni dedicate strettamente al cuore, dove avevo esaminato più l'aspetto di funzionalità del ventricolo sinistro e le ripercussioni sul circolo sistemico. Perché il cuore di destra va incontro a una condizione di scompenso così facilmente? Scompenso che può essere acuto, cioè determinarsi molto rapidamente, come avviene nell'embolia polmonare oppure nelle gravi insufficienze respiratorie come ad esempio lo pneumotorace oppure anche una bronchite acuta riacutizzata o una polmonite. Essenzialmente perché il cuore di destra ha una parete più sottile e il suo svuotamento è determinato non solo dalla contrazione muscolare ma anche dalle trazione che la contrazione del ventricolo sinistro determina, e dal fatto che il circolo polmonare ha per definizione basse pressioni, basse resistenze al flusso, un'elevata compliance, una capacità di variare i flussi con bassissime variazioni di pressione: durante l'attività fisica il flusso

circolatorio del circolo sistemico aumenta di dieci volte, ovviamente deve aumentare nella stessa misura nel circolo polmonare, e mentre nel circolo sistemico l'attività fisica si accompagna a un incremento della pressione arteriosa, nel circolo polmonare l'incremento della pressione arteriosa durante l'esercizio fisico è estremamente contenuto: siamo sempre sotto quei 20 mmHg che impediscono la formazione dell'edema polmonare, e comunque sia c'è un elevato gradiente per cui il circolo polmonare riesce ad essere sempre un circolo senza trasudazione. Quindi è una condizione circolatoria che per certi aspetti è estremamente delicata. Come avviene l'incremento di flusso a livello polmonare in condizioni di aumentata attività fisica? Abbiamo un'elevata compliance della circolazione polmonare perché la struttura anatomica delle arterie polmonari del circolo arteriolare polmonare offre una parete a minore struttura muscolare, e quindi una minore capacità contrattile, ma una elevata distensibilità, un'elevata compliance. E poi c'è il fenomeno del reclutamento del capillare polmonare che permette di favorire gli scambi e favorire i flussi a bassa pressione; e l'elevato tono vasodilatante che caratterizza durante l'attività fisica il circolo polmonare. Quindi le resistenze al flusso del circolo polmonare in condizioni fisiologiche tendono ad essere mantenute molto basse e tendono a ridursi ulteriormente durante l'attività fisica: questo permette di mantenere flussi polmonari elevati senza incremento di pressione. L'aumento consensuale dell'attività di ventilazione polmonare che avviene durante l'esercizio fisico fa sì che si possa determinare un incremento degli scambi polmonari. Quindi il circolo intraalveolare, quello che permette gli scambi, aumenta senza aumento di pressione: quindi il ventricolo di destra non subisce mai, in condizioni fisiologiche, alcun deficit funzionale per il sovraccarico di lavoro. Nelle forme sia ostruttive che restrittive si determina invece una condizione che costringe il cuore di destra a lavorare a pressioni più elevate: questo perché l'aumento delle resistenze al flusso è determinato da un duplice incremento, ad esempio nelle forme ostruttive vediamo l'aumento di pressione alveolare e di pressione pleurica; nelle fasi espulsive le pressioni intratoraciche che si determinano sono estremamente elevate. E in più si determina un altro fenomeno, che in condizioni di deficit polmonare provoca minore capacità di scambio, che risulta in un'ipossia la quale a sua volta nel circolo polmonare determina dei meccanismi che portano a vasocostrizione delle arteriole polmonari. Quindi mettendo insieme questi due fattori si determina una condizione per cui la pressione in arteria polmonare (in condizioni fisiologiche sempre inferiore a 20 mmHg) tende ad aumentare, fino a 70 mmhg: questo vuol dire che si è determinata una condizione di ostacolo al flusso intrapolmonare, un aumento delle resistenze, tale da determinare un incremento considerevole delle pressioni nell'arteria polmonare e quindi nel ventricolo di destra, di conseguenza anche nell'atrio di destra e poi anche un incremento consensuale retrogrado delle pressioni venose nel circolo sistemico. Un sovraccarico di volume determina, entro una certa misura, un aumento della forza contrattile però la struttura intrinseca della parete del ventricolo di destra è tale per cui la capacità di adattamento del ventricolo attraverso l'incremento della contrattilità è limitata: il sovraccarico di volume determinerà dunque un progressivo instaurarsi di un'ipertrofia di tipo eccentrico, di tipo dilatativo del cuore di destra. Un **aumento delle pressioni del circolo venoso sistemico** determinerà una minore differenziale di pressione a livello dei capillari periferici, quindi una minore capacità di recupero di liquidi a livello capillare periferico e quindi la formazione dell'**edema**. Lo scompenso del cuore di destra è caratterizzato proprio dalla comparsa massiva dell'edema periferico. Quando avete edema periferico e scompenso cardiaco è sicuramente espressione di un'alterazione del circolo polmonare, che può essere secondario allo scompenso del cuore di sinistra oppure può essere intrinseco a una patologia polmonare; il termine **"cuore polmonare"** indica lo scompenso del cuore di destra che avviene come <u>conseguenza</u> di una patologia polmonare. Quindi abbiamo un cuore che non è alterato strutturalmente, un cuore di sinistra con attività contrattile mantenuta (ma vedremo in realtà le conseguenze dello scompenso del cuore di destra sul cuore di sinistra) e un cuore di destra che è invece in sovraccarico di volume e quindi tenderà a una dilatazione, quindi aumenteranno le pressioni in atrio di destra, aumenta la pressione nel circolo cavale, aumenta la pressione nel circolo periferico, aumenta la pressione nel circolo venulare e quindi la capacità di riassorbimento dei liquidi viene meno: si determina così

l'edema generalizzato. Siccome c'è una bassa ossigenazione questi soggetti oltre all'edema tendono ad avere la cianosi, cioè una pigmentazione bluastra della mucosa, della cute. L'ostacolo al flusso polmonare può avvenire anche con dei meccanismi non legati alla patologia del parenchima polmonare, ma a patologia del flusso ematico polmonare: per processi di vasculite (infiammazione dei vasi) oppure di microembolia ma soprattutto per l'embolia polmonare; l'embolia polmonare consiste nella formazione di trombo venoso da cui si distacca un embolo che va ad occludere il circolo dell'arteria polmonare. Tanto maggiore è la dimensione del trombo che embolizza, tanto maggiore sarà l'ostacolo al flusso, di conseguenza tanto maggiore sarà l'aumento delle resistenze che si determina e tanto maggiore sarà l'incremento di pressione nel cuore di destra: tanto più importante sarà dunque la condizione di scompenso cardiaco. Una condizione di questo tipo tende ad avere una manifestazione acuta, si manifesta cioè in tempi molto rapidi. Una delle classiche manifestazioni dell'embolia polmonare è lo scompenso, appunto, del cuore di destra che può portare, per distensione dell'atrio di destra, a fenomeni aritmici o arresto cardiaco; se abbiamo una condizione di questo tipo, che si sia sviluppata acutamente o cronicamente (ma quanto più acutamente si manifesta, tanto più diventa evidente il fenomeno), allora anche il cuore di sinistra tende ad essere malfunzionante, perché se c'è una riduzione ai flussi nel circolo polmonare avrò un minore riempimento del cuore di sinistra e una minor capacità di "spinta in avanti", quindi minor pressione nel circolo sistemico, minor ossigenazione dei tessuti, e quindi una condizione di scompenso del circolo sistemico. Quindi una delle conseguenze, soprattutto nelle fasi acute, delle patologie polmonari (sia di tipo parenchimale sia causate da ostacoli al flusso ematico) è lo scompenso acuto del cuore di dx che determina un'ipoperfusione tissutale da riduzione della gettata sistolica da parte del ventricolo sinistro. Se questo avviene lentamente il processo assomiglia in tutto e per tutto a uno scompenso globale congestizio… quindi si fa fatica a distinguere la causa! Qui si determina quello che si determina anche nelle fasi apprezzate dello scompenso sinistro: aumenta la pressione nel circolo polmonare, aumenta la pressione nel cuore di destra, c'è edema. In questo caso parte prima dall'ostacolo del circolo polm e poi si ripercuote sul cuore di sinistra.
Allora oltre che i bassi flussi del circolo polmonare c'è un secondo fenomeno, che soprattutto nelle fasi acute dello scompenso del cuore di destra è importante: è quello che si chiama conflitto spaziale tra ventricolo di destra e di sinistra; come vi dicevo, in condizioni fisiologiche la contrazione del ventricolo sinistro governa in parte la contrazione del ventricolo di destra, perché lo trascina: la parete viene "trascinata" e quindi lo svuotamento *(del ventricolo destro, N.d.R.)* è in parte passivo; tanto che se ci fosse un infarto nel cuore di destra potrebbe anche non dare manifestazioni di sé, perché il cuore sinistro è sufficiente nella sua forza contrattile, dal momento che trascina il cuore di destra. Se dovesse aumentare improvvisamente, ma anche cronicamente, il volume del contenuto del cuore di destra si avrà una riduzione della capacità di contenere sangue del cuore di sinistra perché il setto viene spinto verso il lume del ventricolo di sinistra; quindi la capacità di riempimento in diastole è ridotta anche per questo motivo: il cuore di sinistra diventa fortemente inefficiente per una condizione di sovraccarico di volumi e pressioni del cuore di destra. È quello che si definisce conflitto spaziale e che spiega alcuni paradossi: ad esempio un soggetto che si trova in queste condizioni avrà un deficit di perfusione dei tessuti (per problemi al cuore di sinistra), avrà un'attivazione del sistema renina-angiotensina, tenderà ad aumentare la ritenzione idrosalina, avrà pressioni molto basse però risponde alla terapia diuretica perché questa riduce il volume del cuore di dx. Quindi si determina una condizione di elevatissimo precarico del cuore di destra e bassissimo precarico nel cuore di sinistra. Tenete presente che è una condizione tutt'altro che infrequente perché può verificarsi anche nelle fasi avanzate dello scompenso congestizio: un deficit iniziale del ventricolo di sinistra, aumento della pressione nel circolo polmonare e aumento delle pressioni e dei volumi nel cuore di destra per cui si determina un conflitto spaziale e il cuore di sinistra diventa ancora più inefficiente.

Lezione di Patologia generale e fisiopatologia clinica (sem2) del 8/4/2013 (1)

Lezione di Patologia generale e fisiopatologia clinica (sem2) del 09/04/2013

Prof. Cassatella

Sbobinatore: Franch Doriana

(mancando i 5 minuti iniziali della lezione dalla registrazione scrivo quanto ho scritto sugli appunti, Ndr)

SLIDE Figure 1: The IL-12 family.

I recettori delle citochine appartenenti alla famiglia di IL-12 condividono catene e avviano vie di trasduzione di tipo Jak-Stat (Stat4 per la IL-12); alcune di queste citochine hanno azione pro infiammatoria, altre immunosoppressiva.

IL-12 è la citochina che induce la maturazione verso linfociti Th1 e inibisce quella di Th17.

IL-23 svolge una serie di azioni, la più importante è il mantenimento del fenotipo Th17.

La maturazione dei sottotipi di linfociti è un processo che avviene in tappe e più citochine hanno ruoli diversi nelle varie fasi.

IL-17 ha ruolo sia attivatore che inibitore: ha azione positiva su fenotipo Tfh e negativa su quello Treg (questi ultimi producono IL-35, citochina ad attività immunosoppressoria).

SLIDE Figure 9-11 Biologic actions of IL-2.

Le APC presentando l’antigene ai linfociti T naive (associato a MHCII ed a una serie di molecole costimolatorie, che nelle fasi iniziali sono fondamentali) inducono nel linfocita T, che deve maturare, una serie di risposte tra cui la produzione di **IL-2** e l’espressione di una catena del recettore che lega IL-2 stessa. IL-2 agisce in modo autocrino sui linfociti CD4+ inducendone la proliferazione e la differenziazione, agendo assieme alle altre citochine che si possono trovare nell’ambiente, prodotte da altre cellule, ad esempio le APC, in risposta allo stimolo eziologico.

SLIDE Figure 9-2 Phases of T cell responses.

Qua vedete ancora la presentazione degli antigeni al linfociti T, che producono IL-2, che agisce sul recettore, che nel frattempo viene indotto su queste cellule, ed induce un'iniziale espansione clonale, poi a seconda dell'ambiente si avrà la differenziazione nei vari sottotipi di CD4+.

SLIDE Figure 9-10 Regulation of IL-2 receptor expression.

Il recettore completo per IL-2 è composto da tre catene: α, β, γ. Il linfocita naive esprime un recettore composto solo dalle catene β e γ e questo ha una bassa affinità, rispetto al trimero completo. Al momento della presentazione dell'antigene, contemporaneamente alla produzione di IL-2, si ha anche l'espressione della catena α, per cui si forma il recettore completo che ha elevata affinità per IL-2, quindi si avrà la condizione ottimale per la proliferazione dei linfociti.

SLIDE Changes in surface molecules after T cell activation.

Quello che succede nel tempo durante l'attivazione dei linfociti CD4+ è l'induzione di una serie di fattori di trascrizione (tra cui Fos ma molti altri) responsabili dell'attivazione genica e quindi l'espressione di:

- **IL-2**,

- **catena α** del recettore per IL-2,

- **CD69**, marcatore che segnala attivazione delle cellule,

- **CD40L** che appartiene alla famiglia TNF e agisce su cellule bersaglio con CD40,

- vari **mediatori** che in maniera autocrina o paracrina inducono proliferazione e differenziazione.

In breve tempo si ha amplificazione della risposta e produzione di linfociti specifici che mediano risposte effettrici appropriate.

Quindi IL-2 è una citochina cruciale, importante perchè:

1. Facilita l'espansione clonale dei linfociti attivati,
2. guida la polarizzazione nei vari tipi di linfociti T,
3. permette lo sviluppo delle Treg, assieme ad altre citochine,
4. attiva le cellule NK, inducendo la proliferazione e potenziando l'attività citotossica,
5. in certe situazioni può agire sui monociti, e altre cellule.

È una citochina che si sta studiando molto perché è un potente attivatore del sistema immunitario, ma il suo impiego in clinica è complicato perché il suo utilizzo ha una serie di effetti collaterali. Tuttavia in alcuni centri viene usata per promuovere l'attivazione delle linfochine activated cells (LAK). Si fa una sorta di immunoterapia: consiste nel prelevare leucociti da pazienti, che devono essere sottoposti a chemioterapia, trattarli in vitro con IL-2 e in seguito queste LAK vengono reiniettate. Le LAK sono quindi cellule NK attivate.

IL-2, IL-4, IL-21, IL-7, IL-9, IL-15 sono tutte citochine che si legano a recettori che condividono la γ chain e agiscono prevalentemente sulle cellule linfoidi.

Esistono alcune patologie genetiche in cui sono coinvolte queste citochine. Ad esempio una di queste SCID riguarda pazienti che non esprimono la γ chain, per cui non sono in grado di rispondere a tutte queste citochine. Un'altra riguarda la deficienza di Jak3, che è la chinasi che viene poi attivata dalla γ chain.

IL-15

È il fattore di crescita per la maturazione delle cellule NK, ma è anche in grado di agire attivando le NK mature (funziona in maniera analoga all'IL-2, il recettore è molto simile).

SLIDE Fig. 1 Trans-presentation of IL-15 to IL-15 responding cell.

IL-15 può funzionare secondo due modalità:

1. in maniera solubile dopo essere stata rilasciata,
2. attraverso trans-presentation, può cioè essere prodotta da cellule mieloidi e dopo la sintesi viene associata alla catena α (questa unione avviene a livello del Golgi) e poi, in coppia, vengono esposte sulla membrana. Possono essere presentate, così associate, alle cellule NK (che non hanno la catena α, ma solo β e γ) che così riescono a rispondere a IL-15.

- IL-15 gisce sulle NK mature attivandole, aumentandone la sopravvivenza e proliferazione.

- Ha azione sinergistica o additiva con IL-12 e IL-18 in base alle concentrazioni in cui si trovano.

- Molti leucociti possono rispondere a questa citochina, che in generale ha ruolo attivatorio, promuove la sopravvivenza e in certi casi aumenta l'attività funzionale, anche quella citotossica.

POLARIZZAZIONE DEI LINFOCITI T HELPER (CD4+)

Questi linfociti possono differenziare in vari fenotipi:

- T reg: controllano l'attività delle cellule attivate agendo da immunoregolatori attraverso la produzione di citochine come IL-10, IL-35 e TGFβ.

- Th1 indotti da IL-12 e specializzati nel produrre IFNγ.

- Th2 indotti da IL-4 e IL-2. Questi linfociti producono IL-4, ma se nell'ambiente è presente TGFβ si differenziano in Th9 che producono IL-9.

- Th17 indotti da diverse molecole e producono IL-17.

- TFh che producono IL-21.

- Th22.

Dal punto di vista della loro azione biologica tutte queste cellule si avvalgono di cellule effettrici, per cui possiamo anche classificarle sulla base delle loro cellule bersaglio. Th17 per esempio sono in grado di reclutare neutrofili e monociti, cioè cellule specializzate ad eliminare i patogeni che hanno indotto la differenziazione dei LT stessi.

SLIDE Figure 9-15 Development of Th1 cells.

Th1

Sono prodotti per azione di **IL-12**, citochina importante soprattutto nelle fasi iniziali e che viene prodotta dalle APC in risposta a patogeni intracellulari. I LT naive indotti, dopo l'interazione con le APC e IL-12, cominciano a proliferare. IL-12 agisce (anche in modo autocrino durante la polarizzazione) inducendo nei LT la produzione di **IFNγ**, che è caratteristico dei Th1 maturi e viene usato come marcatore.

In realtà la maturazione di questo linfocita CD4+ verso il fenotipo Th1 avviene in tappe, durante le quali partecipano diverse molecole, oltre a IL-12 anche IL-18.

Il linfocita T naive esprime una sola catena dell'IL-12R (IL-12Rβ1, *Ndr),* poi l'IFNγ prodotto induce l'espressione anche della catena β2 e solo una volta che è presente il recettore completo la cellula può rispondere a IL-12. La risposta a IL-12 nel linfocita è mediata da **STAT4** che induce la produzione ulteriore di IFNγ. Inoltre durante questo processo viene anche aumentata l'espressione di una delle catene del recettore per IL-18. **IL-18** è una citochina che può essere prodotta nell'ambiente e come IL-23 promuove un'ulteriore maturazione e stabilizzazione dei Th1, che producono IFNγ, linfotossina α, TNF,….

Queste citochine (principalmente IFNγ) vanno ad attivare macrofagi, LT CD8+,… cellule fondamentali per eliminare patogeni intracellulari.

SLIDE Figure 10-5 Function of Th1 cell.

- La funzione classica di IFNγ, prodotto dai Th1, è quella di attivare i macrofagi di tipo M1, che aumentano la loro capacità citotossica di uccidere i patogeni intracellulari.

- Inoltre IFNγ va a far produrre ai LB quegli anticorpi che hanno funzione opsonizzante.

(Per cui da una parte attiva funzionalmente i macrofagi, dall'altra potenzia la fagocitosi.)

- Viene anche favorita l'espressione di un FcγR, che va a legare gli anticorpi prodotti dai LB (che sono stati stimolati da IFNγ) e permette la fagocitosi. L'espressione di questo recettore (il CD64 o FcγR1) si ha nei macrofagi, che ne hanno già un po' di default, e nei neutrofili.

- Linfociti Th1 agiscono anche a livello dei CD8+ potenziandone l'attività citotossica.

- I neutrofili rispondono alla linfotossina e al TNF prodotti da Th1.

Th2

Si formano in seguito ad infezioni da parassiti, elminti per esempio. L'APC presenta l'antigene alla cellula T naive e in seguito a questa interazione, i linfociti cominciano a proliferare e produrre **IL-4**.

Ci sono varie teorie sulla produzione di IL-4:

- Il LT produce un livello basale di IL-4 che viene aumentato dopo l'interazione con l'APC,

- Oppure potrebbe provenire dall'ambiente: da mastociti, basofili, eosinofili…

IL-4 attiva **STAT6** che amplifica la produzione di IL-4, e altre citochine come **IL-5**, **IL-13** che inducono la definitiva maturazione verso questo fenotipo.

Le funzioni effettrici di Th2 sono:

- la produzione di IgE,

- l'attivazione degli eosinofili,

- l'attivazione della secrezione mucosa.

SLIDE Figure 2 CD4+ Th2 differentiation.

APC di vario tipo possono promuovere la differenziazione in Th2 attraverso la produzione di IL-4, ma secondo gli ultimi studi sono i **basofili** ad avere il ruolo principale.

Gli anticorpi che vengono prodotti dai LB, stimolati da IL-4, si legano al parassita e vengono riconosciuti da recettori che per esempio sono presenti sugli eosinofili. Viene favorita tramite questi l'interazione tra il parassita e gli eosinofili, che degranulando liberano tutte le proteine citotossiche. Le stesse IgE, nelle patologie allergiche, possono

legarsi anche ai mastociti inducendone la degranulazione.

Anche nel caso dei Th2 sono molte le citochine che collaborano nelle diverse fasi.

IL-5 attiva gli eosinofili maturi ma è anche un fattore di crescita per queste cellule che agisce a livello del midollo.

IL-4 e Il-13 sono in grado di attivare i macrofagi ma secondo un fenotipo di tipo M2, che favorisce la riparazione dei tessuti (cicatrizzazione, produzione di tessuto connettivo).

I Th1 e i Th2 sono stati i primi ad essere scoperti ed è importante trovare i marcatori che permettano di identificarli all'interno di un infiltrato, per capire il tipo di patologia e come trattarla.

Sono tanti i criteri di classificazione che si possono usare:

- <u>Sulla base delle citochine</u> specifiche che vengono prodotte: IFNγ per i Th1, IL-4 per i Th2, e altre in comune in determinate situazioni.

- <u>Marcatori di superficie</u>: ci sono anticorpi che riconoscono queste molecole e possono essere usati ad esempio per fare analisi immunoistochimica.

Spesso vengono usati come marcatori i recettori per chemochine. Ad esempio i Th1 esprimo il CXCR3 in maniera preferenziale (le chemochine che legano il CXCR3 e sono indotte dall'IFNγ sono: CXCL9, CXCL10, CXCL11 cioè MIG = Monokine induced by gamma interferon, IP-10 = Interferon gamma-induced protein 10, I-TAK = Interferon-inducible T-cell alpha chemoattractant). Mentre i Th2 esprimono preferenzialmente CCR4, CCR8, CXCR4 e anche CCR3.

Ad oggi è possibile riconoscere in laboratorio questi marcatori usando un citofluorimetro. Si usano anticorpi marcati con sostanze fluorescenti che legando determinati antigeni, così se la cellula esprime quella molecola legherà quell'anticorpo. In questo caso bisogna permeabilizzare le cellule perché si misurano le citochine intracellulari, per cui la cellula diventerà fluorescente. Si possono usare fino a 10-12 anticorpi diversi in uno stesso campione a seconda dello strumento.

SLIDE Cytokine production by differentiated Th1 and Th2 cells.

Qui vedete una popolazione in cui sono stati usati due anticorpi: uno contro IFNγ e uno per IL-4. Le frecce indicano l'intensità di fluorescenza. Ad esempio una popolazione pura di Th1 è composta da cellule positive per IL-4 e negative per IFNγ. Chiaramente sono esperimenti fatti in vitro partendo da cellule isolate dai tessuti del paziente.

SLIDE Table 12-3 Pathophysiologic conditions associated with prevalent Th1 or Th2 responses

Oggi esiste anche il tentativo di classificare le patologie, che riguardano patologie immunitarie infiammatorie, sulla base del tipo di risposta immunitaria prevalente. Qua avete una serie di esempi.

Th17

Richiedono per la loro maturazione una serie di citochine: **TGFβ, IL-6, IL-1**, che vanno ad attivare il fattore di trascrizione **ROR-γt** e poi hanno bisogno di **IL-23** e **IL-21** per essere stabilizzate nel fenotipo Th17 e produrre **IL-17**.

Th17 maturano in risposta a **patogeni extracellulari** come funghi e batteri.

L'APC presenta l'antigene al LT naive, produce IL-6, IL-1, IL-23 e nell'ambiente c'è bisogno di TGFβ per favorire la maturazione dei Th17.

Per quanto riguarda le funzioni effettrici, sono causa di infiammazione, attraverso la produzione di altre citochine.

SLIDE Fig.1 Overview of IL-17 family ligands.

La famiglia delle IL-17 è composta da 5 membri: A, B, C, D e F. Le citochine prodotte dai linfociti sono solo IL-17A e F che agiscono sullo stesso recettore. (C'è poi la IL-17E che non centra niente con le altre IL-17 e corrisponde a IL-25, prodotta dai Th2.)

Altre cellule producono IL-17 coadiuvando l'azione dei Th17 sono: linfociti T, altri linfociti γδ, αβ, NKT,….

Cellule bersaglio di IL-17 sono cellule endoteliali, epiteliali, macrofagi, condrociti, osteoblasti….Le azioni che svolge sono diverse, principalmente promuove la risposta infiammatoria attraverso la produzione indiretta di altre citochine classiche: IL-8, IL-6, CCL-20 o IL-23α, G-CSF, GM-CSF, cioè citochine che agiscono su monociti e granulociti.

Altre citochine oltre IL-17 sono prodotte dai Th17, come la IL-22, IL-23 e IL-26. Attraverso queste i Th17 promuovono l'infiammazione e reclutano di neutrofili, importante per eliminare i patogeni extracellulari.

- IL-22 favorisce le risposte difensive a livello delle barriere, perché stimola la produzione di peptidi antimicrobici da parte delle cellule epiteliali.

- Attraverso IL-17, IL-22 e IL-26, i Th17 hanno effetti sia diretti che indiretti.

<u>Indiretti:</u> agiscono su cellule bersaglio: fibroblasti e cellule endoteliali, che sono a loro volta stimolate a produrre ad esempio la chemochina CXCL8 che agisce sui neutrofili favorendone il reclutamento.

<u>Diretti:</u> IL-21 agisce direttamente sulle cellule bersaglio, IL-17 sui macrofagi, altre citochine agiscono sui neutrofili.

Le cellule bersaglio delle citochine prodotte da Th17 sono in grado di produrre una serie di mediatori che favoriscono reclutamento di granulociti, contribuiscono al protrarsi della risposta

infiammatoria e se tutto questo non è adeguatamente controllato i Th17 sono responsabili di tutta una serie di patologie infiammatorie e/o autoimmuni.

Un circuito importante riguarda Th17 e neutrofili.

Th17 producono il G-CSF, che è il fattore di crescita per i neutrofili; quindi da una parte viene indotta la loro produzione e dall'altra vengono attivati. Questo circuito, se tutto funziona in maniera corretta, viene spento dalla morte per apoptosi dei neutrofili. I corpi apoptotici vengono fagocitati dai macrofagi dei tessuti e questo determina una riduzione della produzione di IL-23 da parte di questi. La diminuzione del livello di IL-23 a sua volta determina minore formazione di IL-17, cui consegue diminuito G-CSF, per cui meno neutrofili prodotti dal midollo osseo.

Treg

Sono linfociti regolatori che per formarsi hanno bisogno di **TGFβ**.

Se in seguito all'interazione con le APC oltre a TGFβ è presente IL-6 viene promossa la polarizzazione verso il fenotipo Th17. Mentre se è presente solo TGFβ maturano i Treg.

FOXP3 è un fattore di trascrizione fondamentale (è un master regulator) per la produzione di questo sottotipo Th.

Come marcatori dei vari sottotipi di linfociti (oltre ai recettori o le citochine) si usano anche i fattori di trascrizione, definiti come master regulator di queste cellule.

T-bet per Th1

Gata-3 per Th2

ROR1 per Th17

FOXP3 per Treg

Sono stati identificati grazie all'uso di topi knock-out.

Esempio. Lo "Scurfy" mouse è il topo knock-out per FOXP3, questo deficit risulta in una mortalità precoce dovuta ad un'infiammazione generale non controllata. Negli organi linfoidi si accumulano cellule infiammatorie perché non c'è nessun controllo da parte di Treg.

I Treg sono molti: alcuni si formano direttamente nel timo, altri in periferia. Si caratterizzano in generale per la loro capacità di produrre IL-10, TGFβ.

Alcuni sottotipi di Thelper in certe situazioni possono shiftare (c'è plasticità), passando ad esempio da Th1 a Th17, ma mai da Th1 a Th2.

SLIDE tabella riassuntiva.

Inibitori. Durante la maturazione di un sottotipo di linfocita Th, la molecola signature (*cioè la citochina chiave per quella determinata polarizzazione, Ndr*) può andare ad inibire la polarizzazione verso gli altri fenotipi.

CITOCHINE IMPORTANTI PER LINFOCITI B

SLIDE Cytokines in B cell growth and differentiation.

Le citochine importanti per i linfociti B sono molte:

- IL-2 in combinazione con altre come IL-4 e IL-5 induce la proliferazione dei LB attivati,
- IL-4 promuove la produzione di IgE (in questa azione IL-4 è inibita dal IFNγ)
- IL-5 e TGFβ promuovono la formazione di IgA.

SLIDE Figure 1 The TNF and TNFR superfamilies

I membri della famiglia TNF sono molto importanti non solo nell'ambito delle risposte immunitarie ma anche in molti altri processi: sopravvivenza, apoptosi….

Negli ultimi anni sono state scoperte due citochine appartenenti a questa famiglia: **BAFF** e **APRIL**, che sono importanti per l'omeostasi dei linfociti B. Regolano infiammazione, sopravvivenza e produzione di alcune immunoglobuline. Possono funzionare, così come vari membri di questa famiglia, sia in forma legata alla membrana che in forma solubile. Legano una serie di recettori: il BAFFR è specifico per BAFF, mentre invece TACI e BCMA è condiviso da BAFF e APRIL.

Queste due citochine attivano la <u>via non canonica di NFkB</u>, portando all'attivazione del complesso RelB-p52, che deriva da p100 (*p52 deriva da p100, Ndr*).

SLIDE con le tabelle sulle patologie in cui sono coinvolti BAFF e APRIL.

È importante sapere che queste due citochine sono coinvolte in patologie che riguardano i linfociti B, non solo patologie autoimmunitarie e infettive, ma hanno un ruolo anche nei tumori B (leucemie, linfomi di Hodgkin's o Non-Hodgkin's, mieloma multiplo), dove agiscono in modo incontrollato. Esistono dei farmaci per trattare queste patologie che o vanno a bloccare la citochina direttamente o legando il recettore. Ad esempio un anticorpo usato a questo scopo è belimumab, che lega BAFF solubile.

ESITI DELL'INFIAMMAZIONE ACUTA

- La **GUARIGIONE,** che avviene secondo due modalità:

Risoluzione, cioè le cellule danneggiate vengono rigenerate, sono del tipo originario ed è ripristinata la funzione originale.

Riparazione, o organizzazione fibrosa quando c'è stata perdita di tessuto; si ha rimozione dell'essudato infiammatorio e sua sostituzione con tessuto connettivo.

SLIDE RISOLUZIONE

Nel grafico vediamo la tempistica degli eventi che avvengono nel caso in cui il processo vada incontro a risoluzione, per cui durante infiammazioni acute lievi.

La risoluzione comporta:

- Neutralizzazione o la perdita di attività dei mediatori chimici,
- Ripristino della normale permeabilità vascolare,
- Cessazione dell'infiltrazione leucocitaria,
- Morte dei neutrofili,
- Rimozione di liquido e proteine, leucociti, agenti estranei e detriti necrotici dalla sede del danno.

I linfociti e i fagociti hanno ruolo determinante durante questi eventi.

Durante le prime fasi i mediatori prodotti sono pro infiammatori, nelle fasi finali mediatori per la risoluzione, come TGFβ, IL-10, ma anche TNF-α e IFNγ, che paradossalmente nelle fasi finali hanno effetto antiinfiammatorio. Importanti sono anche i lipidi, come la lipossina, resolvine, protectine, maresine che hanno ruolo antiinfiammatorio.

La diminuzione del reclutamento dei neutrofili nelle fasi finali si ha grazie alla produzione di lipossine che lo inibiscono e favoriscono l'arrivo dei monociti. E i neutrofili vengono eliminati dai macrofagi, che in seguito producono ulteriori mediatori antiinfiammatori.

Oppure l'infiammazione acuta può terminare con la riparazione tramite sostituzione con tessuto connettivo. Avviene:

- dopo un danno tissutale di notevole entità,
- quando sono colpiti tessuti che non sono in grado di rigenerare le cellule andate perdute,
- quando vi sia un abbondante essudato ricco di fibrina

Quando l'essudato fibrinoso nei tessuti o in cavità sierose non può essere eliminato, il tessuto connettivo cresce nell'area dell'essudato, con conseguente formazione di una massa di tessuto fibroso, processo detto anche organizzazione (stesso fenomeno che avviene anche nell'infiammazione cronica).

In molte infezioni piogene vi può essere un'intensa infiltrazione di neutrofili con liquefazione dei tessuti, che porta alla formazione di pus. Questo per dire che pus in grandi quantità può voler dire distruzione di tessuto e sostituzione con connettivo fibrotico.

- **PERMANENZA**

Come angioflogosi , cioè permangono i fenomeni vasculo-essudativi.

Oppure può cambiare faccia evolvendosi nell'istoflogosi o flogosi cronica, dove i fenomeni vascolari ed essudativi diminuiscono fino a cessare, mentre sono reclutati altri tipi cellulari come monociti, linfociti, fibroblasti e cominciano a proliferare. Si caratterizza per la prevalenza di cellule mononucleate nell'infiltrato. La flogosi cronica in genere, anche se la causa è stata eliminata,termina con un processo di riparazione e la produzione di tessuto connettivo.

SCOPO DELL'INSORGENZA DELLA FLOGOSI CRONICA:

Se la reazione infiammatoria acuta non ha avuto successo, si creano meccanismi più potenti per eliminare la causa. Quindi lo scopo è avviare funzioni più specifiche ed efficaci.

MECCANISMI DI CRONICIZZAZIONE

Motivi dell'istaurarsi di flogosi cronica:

- La causa persiste,
- C'è materiale estraneo ineliminabile (metalli che stimolano continuamente una risposta),
- Virulenza dell'agente patogeno,
- Scarsa capacità della prima reazione infiammatoria,
- Capacità immunologiche del soggetto scarse, deficit. Ad esempio la malattia granulomatosa cronica è causata dal fatto che i neutrofili non producono i radicali dell'ossigeno e così gli agenti eziologici non sono eliminati e si creano così strutture che cercano di arginare la causa di danno e

vengono reclutate altre cellule che in questo caso continuano a non produrre i radicali, per cui il granuloma persiste.

Altre cause possono essere: incapacità delle cellule di compiere lo switching fenotipico, infiltrazione di cellule immunosoppressorie che spengono le funzioni effettrici, inadeguata produzione di mediatori, risposta anomala o eccessiva alla causa, patologie infiammatorie croniche che comprendono anche i tumori. È stretto il legame tra flogosi cronica e predisposizione a sviluppare un tumore, e anche nel tumore la risposta infiammatoria, che sempre viene montata, può a sua volta favorire lo sviluppo ulteriore del tumore.

CARATTERISTICHE DELLA FLOGOSI CRONICA

- Può essere un processo prolungato,
- Può insorgere secondariamente ad un'infiammazione acuta,
- Spesso nasce come processo primario, ad esempio in patologie da virus.

È un processo infiammatorio in cui prevalgono linfociti, plasmacellule e macrofagi, che sono le cellule fondamentali.

CAUSE PRIMARIE

- Agenti infettivi molto resistenti; riguarda soprattutto patogeni intracellulari, che resistono ai tentativi di uccisione messi in atto dai neutrofili e hanno bisogno dei macrofagi attivati,
- Materiale endogeno necrotico,
- Particelle esogene come asbesto, silicio…, danno patologie polmonari,
- Patologie autoimmuni,
- Patologie infiammatorie croniche come ad esempio il morbo di Crohn, l'artrite reumatoide, la sarcoidosi, che hanno eziologia ignota.

CAUSE SECONDARIE

Riguardano la progressione di una flogosi acuta.

La flogosi cronica può:

- Persistere con i caratteri dell'angioflogosi;

- Proseguire con scarsi fenomeni vasculo essudativi, ma che portano al reclutamento di nuove cellule responsabili della formazione di un tessuto detto istogeno, cioè nuovo tessuto infiammatorio che parte dalle cellule del sangue, cioè monociti e linfociti.

DIFFERENZE PRINCIPALI TRA FLOGOSI ACUTA E CRONICA

La flogosi cronica ha fenomeni vascolo-essudativi più modesti, in pratica si ha scarsa produzione di mediatori vasoattivi (per fenomeni vasculo-essudativi si intende iperemia attiva e passiva e aumento della permeabilità che portano alla formazione di edema essudatizio).

Nella flogosi acuta prevalgono i granulociti, in quella cronica le cellule mononucleate, linfociti e monociti e nella fase riparativa si ha proliferazione di cellule endoteliali e fibroblasti con la produzione di tessuto connettivo.

In quella acuta mediatori vasoattivi e chemotattici per granulociti, in quella cronica fattori che richiamano le cellule specifiche.

Nella flogosi acuta la presenza di fenomeni regressivi è variabile e la durata di solito è breve; nella cronica al contrario sono frequenti i fenomeni regressivi, dura tanto, si risolve con fenomeni riparativi e può derivare da quella acuta o essere cronica dall'inizio.

Il concetto essenziale della flogosi cronica è il cambio di cellularità.

Lezione di Patologia generale e fisiopatologia clinica (sem2) del 9/4/2013 (1)

Lezione di patologia generale e fisiopatologia clinica – 9/04/2013

Professore: Marco Cassatella

Sbobinatore: Laura Galassi

Revisore: Anna Varalta

IL MACROFAGO

I macrofagi si caratterizzano per la diversa distribuzione negli organi sono eterogenei dal punto di vista fenotipico anche se derivano da un unico precursore midollare. Hanno diverse funzioni non solo nell'immunità innata e acquisita ma anche nell'omeostasi tissutale e nel metabolismo.
Sono principali protagonisti della flogosi cronica. Inoltre:

- regolano la proliferazione dei linfociti T e B
- regolano il metabolismo lipidico e il ferro
- sono in grado di eliminare sostanze esogene che devono essere eliminate,ma anche cellule e molecole endogene
- regolano la proliferazione cellulare tramite fattori di crescita
- detossificano e immagazzinano sostanze esogene contro i tumori,
- possono avere attività citotossica
- proteggono contro batteri virus
- regolano l'infiammazione acuta
- regolano proteasi
- regolano la coagulazione e fibrinolisi per la capacità di produrre componenti dei vari sistemi polimolecolari solubili

MATURAZIONE, MIGRAZIONE NEI TESSUTI E SPECIALIZZAZIONE

I macrofagi dei tessuti derivano da un precursore che si trova nel midollo, nella slide si vedono le varie fasi della maturazione ma mancano le citochine, la principale in particolare negli stati più tardivi è GMCSF. La maturazione dura 10-12 giorni nel midollo e poi si formano i monociti.

Nella slide sono illustrati i monociti del topo , il topo presenta due popolazioni di monociti in circolo con un fenotipo di cellule quiesciente e un fenotipo infiammatorio.

Il **MONOCITA CIRCOLANTE** è un cellula di dimensioni notevoli con un nucleo a fagiolo che permette di essere identificato facilmente nel vetrino, ha una quantità maggiore di citoplasma rispetto ai linfociti.

I monociti sono in grado di migrare nei tessuti e si specializzano es, nell'osso maturano in osteoclasti, nel cervello originano le cellule della microglia, nei polmoni originano i vari tipo di macrofagi alveolari, nel fegato le cellule di Kupffer e i macrofagi che si trovano negli organi linfoidi come nella milza (polpa bianca, polpa rossa)

SOTTOPOPOLAZIONI MONOCITARIE

Nell'uomo in generale parliamo di monociti,ma in realtà si identificano delle sottopopolazioni

– classici, che costituiscono il 90 % della popolazione totale di monociti che si possono fenotipizzare con un marcatore specifico es.**cd14** che lega lps (recettore accessorio delle cellule mieloidi molto espresso nei monociti classici che sono poveri di cd16 che é fcgamma receptor 3)

– intermedi che ha livelli di **cd 14** simili ai classici ma **cd 16** molto più alti

– non classici con bassi livelli di cd14 e alti livelli di cd16

oggi c'è un grande interesse verso queste sottopopolazioni perche si possono dividere tramite citofluorimetro e vedere se il comportamento è uguale in riposta agli stessi stimoli.

I monociti dal sangue **migrano** nei tessuti e i macrofagi localizzati nei tessuti costituiscono il sistema delle cellule fagocitarie mononucleate tissutali. Queste cellule possono essere identificate perche presentano marcatori evidenziabili con anticorpi per dimostrare cosa originano.

Per esempio i monociti periferici non danno origine solo ai macrofagi ma anche alle cellule dendritiche nei TESSUTI perchè nell'ambiente trovano CITOCHINE capaci di dettare questo processo (gmcf + IL4 da origine in vitro a cellula dendritiche derivante dai monociti che in realtà assomiglia alla cellula dendritiche tissutale).

I **MACROFAGI**:

- sono cellule di dimensioni notevoli (30 micron)
- originano dal midollo non ci sono in circolo
- possono avere diversa capacità proliferativa
- Importante il fatto che abbiano una vita lunga anche di mesi, questo può essere verificato anche in coltura.
- Sono cellule con elevata capacità fagocitaria.
- Esprimono PRR
- possono favorire o limitare l'infiammazione, la riparazione dei tessuti
- possono anche presentare l'antigene, ma a livelli inferiori delle cellule dendritiche.

(slide: the central role of macrophage in immunity end inflammation)

– producono citochine proinfiammatorie in grandi quantità (IL-6, TNF, IL-1, prostaglandine)

– producono citochine che permettono la differenziazione del cd4 helper

– attivano i linfociti

– presentano l’antigene

– favoriscono la riorganizzazione dei tessuti perchè rilasciano: collagenasi, elastasi, fattori che inducono proliferazione dei fibroblasti, fattori proangiogenetici

– possono danneggiare i tessuti con un eccessiva produzione di idrolasi acide, TNF, H2O2

– producono mediatori con attività microbicida (tutti i derivati tossici dell'ossigeno generati dalla NADPH ossidasi, ossido nitrico e i meccanismi ossigeno indipendenti come enzimi)

– hanno attività tumoricida perchè producono sostanze tossiche, H202, proteasi

silde: selected plasma memebrane receptor

I macrofagi sono in grado di saggiare l'ambiente perchè esprimono una varietà infinita di recettori sulla loro superficie

- recettori fc
- recettori per il complemento
- mannose receptor
- molecole di adesione che gli permettono di interagire con altre cellule e ECM
- recettori per citochine e chemochine

slide: selected macrophage derived secretory product

– enzimi

– citochine

da guardare..sono delle industrie capaci di produrre elevatissime quantità di mediatori a seconda dello stimolo e del tessuto a seconda dell'azione

ATTIVAZIONE DEI MACROFAGI

I macrofagi già di per sé sono molto potenti dal punto di vista metabolico ma hanno anche la capacità di attivarsi (*essere attivati* ndr), possono cambiare e aumentare il loro stato funzionale. Questo avviene, per esempio, durante l'infiammazione CRONICA.

L'attivazione avviene secondo diverse modalità, ad esempio:

1) se sottoposti all'azione dell'immunità specifica tramite l'azione dei linfociti T attivati, TH1 che producendo **INF gamma** attivano i macrofagi.(ATTIVAZIONE IMMUNE)

2) l'attivazione può essere dovuta all'azione dell'**endotossina** o altre sostanze senza l'intervento dell'immunità specifica (ATTIVAZIONE NON IMMUNE)

L'attivazione del macrofagi è dovuta a modificazioni quantitative e qualitative della espressione di vari geni e loro prodotti proteici **che conferiscono al macrofago capacità funzionali superiori a quelle dei <u>monociti</u>, dei <u>macrofagi residenti</u> e dai <u>macrofagi appena maturati dai monociti</u> in sede flogistica**.

Domanda: Che differenza c'è tra i macrofagi attivati e quelli maturati in sede flogistica?

Risp:i monociti che arrivano maturano in macrofagi poi l'interferone può agire sia sui monociti appena arrivati e puo attivarli o influenzare le fasi da monocita a macrofago mantenendo o elevando alcune funzioni quindi può attivare diversi stati di maturazione.

L'attivazione prevede:

- cambiamento del **programma genico**
- **aspetti morfologici:** (da osservazione in vitro) aumento delle dimensioni del RE e apparato del golgi, di mitocondri, lisosomi primari e secondari per maggiore neosintesi.
- Capacita di **spreading** (maggiore capacità di adesione visibile sulla plastica dove si parla di forma a "uovo fritto")
- **aspetti metabolici:** aumento ATP cellulare, del consumo di ossigeno, del rilascio di prostaglandine, della pinocitosi in fase fluida

(*Figura 9.11*) Colture di macrofagi in vitro dove assumono una forma rotondeggiante, le stesse cellule sottoposte all'azione di BCG si appiattiscono e iniziano a emettere pseudopodi

PROPRIETA' FUNZIONALI DEI MACROFAGI ATTIVATI

In seguito all'attivazione potenziano le loro funzioni:

- acquisiscono una maggiore attività battericida in quanto:
    - aumentano la loro capacità fagocitaria
    - aumentano fc receptor e complemento che favorisce la fagocitosi
    - aumento nadph ossidasi quindi rispetto a altre cellule in risposta allo stesso stimolo produrrà una maggiore quantità di ROS

- produce NO perche IFNgamma e TNF inducono la produzione dell'enzima, più viene lasciato sotto lo stimolo di queste citochine più aumenta la produzione di radicali tossici dell'azoto
- aumenta citochine e enzimi lisosomiali
- amplificano il processo infiammatorio tramite la produzione di mediatori a vita breve, (PAF eicosanoidi e citochine)
- diventano più efficienti nella presentazione dell'antigene per
    - aumento espressione MHC classe 2 indotto da INF o TNF
    - aumentata espressione di molecole costimolatorie
- possono essere responsabili di danno tissutale sia necrosi che cachessia per elevate produzione di TNF
- cooperano nella fase riparativa connettivale tramite la produzione di citochine enzimi
- uccidono cellule tumorali perchè producono radicali liberi e NO

Questa slide(grafico) mostra la capacità di produrre acqua ossigenata di monociti messi in coltura senza gamma interferone per un certo periodo di giorni: i monociti freschi stimolati che attivano l'ossidasi se vengono messi in coltura si trasformano in macrofagi e nel tempo diminuiscono la loro capacità do produrre acqua ossigenata, quindi in realtà i monociti hanno un maggiore burst respiratorio in coltura.

Se viene aggiunto l'IFN aumenta la capacità iniziale dei monociti di produrre acqua ossigenata. Se l'inf gamma viene aggiunto più tardi la capacità di produrre ROS aumenta di 2 o 3 volte a seconda dell'azione. Quindi L'IFNgamma può <u>mantenere la capacità basale dei monociti</u> di produrre la sostanza o <u>sui macrofagi ne aumenta la produzione</u>

slide: functional responses of macrofages

I vari recettori(IFNgammaR, TLR) possono attivare fattori di trascrizione che influiscono sulla produzione di proteine coinvolte nell'uccisione dei microbi nell'ossidasi, nitrossido sintasi, fattori di crescita. Il tutto serve a uccidere gli agenti patogeni.

L'attivazione serve per riuscire a uccidere gli agenti patogeni che non sono eliminati dall'infiammazione acuta o dai macrofagi residenti nel caso ad esempio vengano infettati da micobatteri perché non producono abbastanza sostanze. Invece nel caso dei macrofagi attivati diventano più potenti <u>per l'attivazione dell'immunità specifica TH1</u> soprattutto per <u>batteri intracellulari</u>

(Figura 16.19) Topi KO per INF gamma infettati da BCG non sopravvivono all'infezione a differenza dei topi wild type.

In altra slide(figura 15-3) si valuta la differenza nella sopravvivenza di batteri nel polmone sia del topo wild type dove si ha una bassa sopravvivenza(dei batteri ndr), nel topo KO per IL 12 aumenta di molto la sopravvivenza di batteri e aumenta ancora con topo KO per interferone gamma.

CITOCHINE DIVERSE ATTIVANO FENOTIPI MACROFAGICI DIVERSI

Sono molte le citochine che possono attivare il macrofagi. Per quanto riguarda il fenotipo M1 sono importanti INF-gamma, TNF soprattutto la combinazione di alcune citochine.

Questa tabella(*figure 1*) illustra una serie di ligandi che possono indurre l'attivazione del macrofago.

Si sapeva che non solo l'IFN gamma ma altri fattori possono attivare i macrofagi.

Oggi si è capito che il fenotipo dei macrofagi che si attiva in risposta a diverse sostante può essere diverso, abbiamo i

- **macrofagi M1** che sono quelli fondamentali per mediare le difese dell'ospite contro patogeni intracellulari, (da *attivazione classica (IFNgamma), altamente pro infiammatori e antitumorali*- scritto negli appunti, controlla sulle slide ndr*)*
- **macrofagi M2** la cui attivazione deriva dall'azione di alcune citochine per esempio IL 4 IL 13 che agiscono su un recettore condiviso. Queste 2 citochine attivano il fenotipo alternativo del macrofago attivato, importante per la regolazione della riparazione delle ferite, può avere anche un ruolo soppressivo e coinvolto nelle parassitosi

esistono anche altri tipi di macrofagi

- **attivati da immunocomplessi** che favoriscono la produzione di elevate quantità di IL 10 e diminuiscono la produzione di IL 12
- **TAMs**(tumor associated macrophage) che si possono isolare nelle fase avanzate del tumore, rispecchiano un fenotipo M2
- myeloid suppressor cell (**MDCSs**) che sono delle popolazioni di cellule mieloidi che possono avere un fenotipo granulocitico o monocitico che vengono prodotte ad alti livelli in pazienti portatori di tumori, si possono isolare dal sangue e si ritiene che infiltrino il tumore diventando TAM o altro. Hanno un azione fortemente immunosoppressiva. Non solo nei pazienti con tumore ma sono presenti anche in pazienti con malattie croniche es TBC, artrite reumatoide LES. Sono molto studiate oggi.

M1 regolano la risposta TH1, gli **M2** sono regolati da citochine della risposta TH2 o anche da altre cellule dell'immunità innata hanno diverse funzioni, come la clearance dei parassiti la promozione tumorale e l'immunoregolazione.Gli M2 si possono suddividere in M2 LIKE a seconda degli stimoli che ricevono.

Il concetto è che esiste *un continuum* di macrofagi attivati che va dagli M1 che sono i macrofagi attivati con attività proinfiammatori tumoricida e battericida fino ad arrivare all'estremo opposto dove ci sono gli M2 che hanno funzioni di controllo regolatorie e immunomodulatorie

MASTER REGULATORS COME BERSAGLI DI FARMACI

I macrofagi attivati derivano da un cambiamento del programma genetico quindi si cerca di identificare i fattori di trascrizione da considerare come master regulator di questi processi. Esistono fattori di trascrizione primari in grado di dettare i vari tipi di fenotipo. Identificarli significherebbe agire con farmaci per modificare l'evoluzione della patologia, cose che si fanno con topi geneticamente modificati

TAMS, INFIAMMAZIONE E CANCRO

I TAM sono una categoria di macrofagi che si riscontrano nei tumori, hanno un fenotipo in alcune proprietà simile agli M2. Studiandoli è emerso il legame tra infiammazione e cancro perchè durante lo sviluppo del tumore inizialmente il sistema immunitario si attiva per cercare di eliminare le cellule tumorali, ma nel microambiente tumorale le cellule tumorali sono in grado di "schiavizzare" le cellule del sistema immunitario in modo da stimolarle a produrre sostanze e mediatori che favoriscono la crescita del tumore. Il tumore manda messaggi ai macrofagi e linfociti T fattori di crescita fattori proangiogenetici.

Si è visto che se isolate e trattate con alcune sostanze possono ripresentare il fenotipo M2

(*Table 1*) Anche nell'ambito dei TAMs si possono suddividere:

– macrofagi che favoriscono l'invasività

– macrofagi attivati che possono uccidere le cellule tumorali

– macrofagi immunosoppressivi

– macrofagi angiogenici

– macrofagi associati alla mestastasi

– macrofagi phoxp3 +

IL MACROFAGO E' LA CELLULA CRUCIALE DELLA FLOGOSI CRONICA

la flogosi **istogena o cronica** la si può inquadrare come

– flogosi **istogena in senso stretto** a sua volta suddivisibile in **flogosi interstiziale diffusa e granulomatosa**. La flogosi interstiziale diffusa spesso evolve in granulomatosa ma non sempre

– se la flogosi istogena continua evolve nella fase finale detta **flogosi istogena connettivale o fibroblastica,** che conclude il processo di guarigione

FLOGOSI CRONICA INTERSTIZIALE DIFFUSA

(legge la definizione) le cellule dell'infiltrato si dispongono in maniera diffusa nell'interstizio come monociti e linfociti talora con tendenza a formare **manicotti perivascolari** addensandosi attorno ai vasi. Sono modesti o assenti segni di trasformazione in monociti macrofagi mentre vi può essere trasformazione dei linfociti in blasti e plasmacellule.

Questa inflitrazione viene indicato come parvicellulare o infiltrato linfomonocitico ed è molto frequente. Quando l'anatomopatologo analizza un tessuto interessato da flogosi cronica parla di infiltrato parvi cellulare.

Alcuni esempi sono flogosi interstiziale da virus (epatite ecc) da rickettsie da micoplasmi da reazioni di ipersesibilità ritardata (tubercolina) fase iniziale associata a processi degenerativi come l'epatite dal alcol

la flogosi interstiziale diffusa si presenta con molte varianti a seconda del tipo di cellule che prevale.

Immagini patologiche di un tessuto come pelle dove si vedono manicotti perivascolare tipico di questo tipo di flogosi

FLOGOSI GRANULOMATOSA

La flogosi granulomatosa è la forma più caratteristica della flogosi cronica. L'evento più caratteristico e prevalente è il GRANULOMA che è costituito da un ammasso organizzato di macrofagi. Può essere definito come una formazione caratterizzata dall'accumulo di fagociti mononucleati con o senza coinvolgimento di altri tipi cellulari.

Il granuloma è strutturato con un corpo centrale di macrofagi di varia natura e vari gradi di attivazione e fenotipo. Serve a limitare l'agente eziologico dovuto all'attivazione dei macrofagi che producono sostanze tossiche che possono portare alle necrosi dei macrofagi stessi e del tessuto (necrosi caseosa in TBCà *si trova centralmente al core* ndr).

Attorno al core c'è una corona di linfociti e eventualmente altre cellule attorno come fibroblasti.

Elementi accessori che si trovano anche nella flogosi interstiziale diffusa sono i linfociti (vari tipi a seconda dell'agente eziologico) e cellule da essi derivate, talora eosinofili e basofili e anche neutrofili nei granulomi da funghi.

Se ci sono solo macrofagi e cellule derivate dai globuli bianchi si parla di **granulomi puri** o se ce attorno una reazione istogena dove sono coivolti anche i fibroblasti o vasi si parla di **granulomi misti.**

N.B la flogosi è un processo che si innesca per difenderci e contemporaneamente per riparare e ricostruire il tessuto

CELLULE GIGANTI ED EPITELIOIDI NEL GRANULOMA

All'interno del granuloma sono presenti delle cellule speciali di origine macrofagica dette CELLULE GIGANTI. Se ne distinguono 2 tipi:

- **cellule tipo Langhans**

- **cellule giganti da corpo estraneo**

Le **cellule di Langhans** sono molto grandi, plurinucleate che si identificano sulla base della disposizione dei nuclei che sono disposte a ferro di cavallo mentre in quelle da **corpo estraneo** i nuclei sono disposti in maniera random.

Le cellule di Langhans sono patognomoniche (= permette di fare immediatamente diagnosi perchè è tipica di una patologia) perchè si trovano nel granuloma tubercolare. Quelle da corpo estraneo sono invece presenti in diversi tipi di granulomi.

Altro tipo reperibile nel granuloma è la CELLULA EPITELIOIDE, sempre di origine macrofagica che ha una forma allungata, si dispone a palizzata. Non si conosco tanto ma si ritiene che derivino da fusione tra vari tipi di macrofagi ma non è chiara.

Le cellule giganti multinucleate potrebbero rappresentare lo stato terminale dei macrofagi attivati che si fondono tra di loro.

Le cellule epiteliodi potrebbero derivare sia da macrofagi immaturi che attivati e loro stesse potrebbero originare cellule giganti multinucleate. (*negli appunti ho scritto che potrebbero anche derivare da macrofagi immaturi DIRETTAMENTE, senza attivazione- controllare su slide* ndr) Queste cellule si ritiene che abbiano un azione detossificante ma non chiaro.

Domanda:le cellule epiteliodi sono polinucleate? No, non sono polinucleate ma derivano in ogni caso dai macrofagi e di grandi dimensioni

mostra immagini di granulomi tubercolari

ISTOGENESI DEL GRANULOMA

Perché si forma un granuloma?

Sulla base di quanto si osserva nella patologia spontanea e nei modelli sperimentali gli agenti che possono causare una flogosi granulomatosa devono rispondere ad alcune caratteristiche:

- devono essere **persistenti, difficilmente eliminabili e non degradabili** (corpi estranei, batteri intracellulari in grado di resistere all'azione dei macrofagi).

Molti patogeni hanno sviluppato <u>meccanismi di resistenza</u>:

- inibiscono la fusione dei fagosomi con i lisosomi impedendo lo scaricamento delle sostanze tossiche
- inibiscono la biosintesi o attività degli enzimi lisosomiali,
- inibiscono l'acidificazione del fagosoma, come i micobatteri, impedendo l'azione degli enzimi litici e non si attiva la nadph ossidasi
- Alcuni come la Lysteria M. vengono fagocitati ma fuori escono dal fagosoma e viaggiano nel citoplasma
- Altri possono contrastare l'azione dei ROS
- si replicano in modo ottimale a ph acido

- è preferibile che siano in **forma particolata**
- debbono creare condizioni di prevalente **chemiotassi** per le cellule mononucleate
- debbono contenere e produrre o **stimolare** la produzione di **fattori** specifici o immunologici che inducano **l'attivazione dei macrofagi**. Es *citochine chemiotattiche* per i monociti come CCL2 CCL3 CCL4 . Inoltre *citochine chemiotattiche per i linfociti* come CCL5 CCL3 CXCL9 10 11 , cito chine che regolano la proliferazione dei macrofagi come IL 3 GM CSF MCSF IFN e citochine che regolano lo stato funzionale dei macrofagi.

Cambia la cellularità perche cambiano i mediatori del reclutamento delle cellule mononucleate.

L'aumento di cellule mononucleate nel granuloma può derivare

- perchè si attiva una proliferazione delle cellule già presenti in loco
- ma soprattutto per il reclutamento di queste dal sangue e dal midollo che poi si attivano (CAUSA MAGGIORE)
- *(Negli appunti ho scritto anche* ndr) perché sono immobilizzati in situ

Una lesione cronica può secondo diverse modalità

- indurre l'attivazione dei linfociti
- determinare l'intervento di fattori chemiotattici di origine batterica
- può produrre fattori di crescita e sostanze che inducono la proliferazione
- fattori chemiotattici

Si avrà quindi un reclutamento di monociti e linfociti e macrofagi per cui aumenta il numero di macrofagi e questo può determinare l'insorgenza della flogosi cronica in senso stresso e poi granulomatosa se i macrofagi cambiano aspetto e diventano cellule epitelioidi e poi cellule giganti.

GRANULOMI IMMUNI E NON IMMUNI

Inizialmente si ha lo sviluppo di **granulomi immuni** dovuti all'attivazione della risposta immunitario specifica con attivazione di linfociti o citochine e **granulomi non immuni** es quelli dovuti da corpo estraneo come da una spina perchè non può essere fagocitata ne eliminata ma comporta una continua produzione di mediatori che nel tempo porta alla produzione del granuloma. I macrofagi arrivano e cercano di circoscrivere il corpo estraneo tentando di farlo fuori ma non ci riescono. La formazione del granuloma non immune è legato alla presenza di corpi estranei come fili di sutura che agiscono sul macrofago ed è il macrofago stesso a produrre i mediatori che ne favoriscono il reclutamento l'attivazione e la formazione del granuloma.

Il granuloma IMMUNE è legato ad esempio all'infezione perchè determina lo sviluppo della risposta immunitaria specifica con attivazione dei linfociti T es nella tubercolosi.

(schema finale)

il granuloma può essere causato da batteri funghi o particelle estranee---> failure of acute inflammatory response----> questo induce la *persistenza* dell'antigene e attiva altri meccanismi:

– si attiva una risposta specifica cellulo mediata

– si attivano i macrofagi che circondano e delimitano la causa nel tentativo di fermare il tutto e di farla fuori

Elenco di alcune CAUSE DI GRANULOMA (importante):

- batteri INTRACELLULARI (tubercolosi lebbra salmonella altri micobatteri ecc)
- elminti (in questo caso si attivano macrofagi M2)
- da metalli
- protozoi
- funghi (istoplasmosi dove possono essere reclutati anche neutrofili, th1 e th17)
- eziologia ignota: ci sono una serie di patologie alcune più frequenti che si caratterizzano per la presenza di granulomi – sarcoidosi in Morbo di Chron

Sulla base delle cellule presenti all'interno del granuloma l'anatomo patologo ne può determinare le cause es nel granuloma di micobatteri sono facilmente reperibili cellule giganti o nella sarcoidosi si possono identificare alcune cellule di tipo langhans ma non c'è MAI la necrosi caseosa.

Caratteri distintivi di alcuni granulomi umani:(da guardare): il tubercolo è la definizione di granuloma nella tbc, il leproma nella lebbra, la gomma luetica, il bottone d'oriente nella leishmaniosi ecc...i caratteri distintivi di ciascuno possono facilitare la diagnosi.

MECCANISMI RESPONSABILI DEI PROCESSI DEGENERATIVI NEL FOCOLAIO INFIAMMATORIO

Durante questa "battaglia" che si instaura nei macrofagi per eliminare la causa persistente si possono generare dei processi che causano danno al tessuto con episodi di necrosi come:

a) effetto tossico diretto della causa

b) spargimento di enzimi litici liberati dalle cellule infiammatorie

c)effetto dei radicali liberi dell'ossigeno prodotti in grande quantità che possono agire all'esterno

d) lo stato immunitario e le citochine es TNF se prodotta in eccesso può essere tossica e nella tbc è responsabile della necrosi infatti topi KO per TNF non formano granulomi e muoiono

e) ipossia

f) condizioni non idonee a un normale equilibrio vitale

EVOLUZIONE DEL GRANULOMA

non guarisce: adesso succede raramente perché esiste la terapia ma può portare all'exitus attraverso la cachessia dovuta soprattutto al TNF

Guarisce: questo avviene dopo che è stato eliminato il tessuto granulomatoso e sostituito da tessuto connettivo. Il 99% dei casi di granuloma esita in tessuto connettivo cicatriziale.

Il granuloma può essere eliminato:

– o con necrosi e espulsione del tessuto necrotico

– o con necrosi e riassorbimento del materiale necrotico e sostituzione con materiale connettivo

Quindi la flogosi istogena lascia sempre delle conseguenze anatomiche (cicatrici) che possono essere accompagnate da conseguenze funzionali più o meno gravi a seconda dell'organo.

[Il tempo è scaduto cassatella è indietro non può spiegare l'ultima lezione che riguarda tutti i meccanismi della flogosi cronica fibroplastica ma dovete farvela !!!!!!!!!!!!!

bisogna studiare bene le varie fasi di formazione del tessuto connettivo giovane, la sua evoluzione in tessuto di granulazione che poi diventa fibroso e sclerotico. Studiare quali sono i fattori e le conseguenze che provoca la formazione di tessuto connettivo. Importante la parte che riguarda i mediatori importanti per la formazione di tessuto connettivo chi sono dove agiscono quali sono le cellule che li producono (TGB) .mi raccomando l'angiogenesi.]

Lezione di Patologia generale e fisiopatologia clinica (sem2) del 10/4/2013 (1)

LEZIONE DI FISIOPATOLOGIA

10/04/2012

Prof MINUZ

Per adeguati scambi capillari è essenziale un ottimale rapporto ventilazione-perfusione. Anche lo spessore dei setti alveolari riveste una grande importanza, poiché per esempio in patologie di tipo restrittivo come la fibrosi polmonare, abbiamo scambi alveolo- capillari alterati ed il risultato è una ridotta capacità di ossigenazione del sangue. Sia in condizioni fisiologiche che nell'esercizio fisico intensivo (quindi con aumentata gittata cardiaca (GC) e migliore capacità di scambio dei gas) gli scambi avvengono nel primo terzo del capillare intralveolare, e questo permette un ampio margine di riserva funzionale dal punto di vista degli scambi.

Quando si verificano condizioni di alterata permeabilità del setto alveolocapillare, il tempo di trasferimento aumenta e l'ossigenazione potrebbe non essere efficace.

IL **PERCORSO DELL'O2** è governato da GRADIENTI PRESSORI,

Le TAPPE:

- la **ventilazione** che serve a far giungere i gas in prossimità dei capillari; capacità di scambio con diffusione attraverso la membrana alveolo-capillare;
- capacità di trasporto, **diffusione** (una delle modalità di trasporto è trasferimento dell'ossigeno molecolare sull' emoglobina all'interno dei globuli rossi, dove è critico il ruolo dell' Hb. E' importante anche la capacità del cuore di determinare una gittata cardiaca sia adeguata a mantenere ossigenazione dei tessuti);
- **distribuzione** tissutale dei flussi, quindi a livello microcircolatorio, per determinare una distribuzione adeguata dell'ossigeno ai tessuti;
- capacità delle cellule di estrazione e quindi **utilizzazione** (in condizioni come lo shock queste ultime fasi del trasporto dell' ossigeno ai tessuti sono alterate).

(Gradienti per O2 e CO2):

In termini dinamici ci sono specifiche modificazioni della concentrazione dei gas che si determinano nell'albero tracheo-bronco-alveolare e nel circolo polmonare del tratto pre- e post-capillare (quindi in arteriole e arterie polmonari e vene polmonari).

Emerge che la concentrazione di ossigeno, di circa 160mmHg (quindi contribuisce per circa il 20% alla pressione atmosferica) arriva con una riduzione di circa il 30% a livello alveolare. Il dato che appare molto più evidente è la concentrazione di anidride carbonica, che è marginale in termini di pressione a livello dell'aria atmosferica e mantiene il valore elevato a livello alveolare. Quindi quello che accade se noi guardiamo le concentrazioni dei gas nel sangue venoso che giunge al distretto alveolo- capillare,la cosiddetta circolazione intra-alveolare, è che si trova un gradiente di pressione considerevole per quanto riguarda l' ossigeno e un piccolo gradiente di pressione per quanto riguarda l'anidride carbonica. La differenza di pressione dell'ossigeno è utile perché determina un passaggio in maniera più marcata dell'aria dall'alveolo al sangue. Considerando anche i tempi di percorso, la superficie di esposizione del sangue venoso all'ossigeno contenuto negli alveoli, questo passaggio è più che adeguato per permettere il raggiungimento di un equilibrio quindi nel tratto post capillare c'è una concentrazione dell'ossigeno che tende ad essere la stessa di quella nell' aria alveolare. Questo vuol dire che lo scambio è ottimale. Questo avviene in condizioni fisiologiche pur considerando che all'interno della struttura polmonare si hanno condizioni piuttosto variegate per cui verso gli apici c'è una maggiore ventilazione rispetto alla perfusione, verso le basi viceversa c'è una maggiore perfusione rispetto alla ventilazione (questo si

verifica in condizioni di respiro corrente, infatti in condizioni di respiro forzato la situazione cambia considerevolmente).

Quindi la capacità di ossigenazione è mantenuta attraverso due meccanismi in condizioni di riposo e in condizioni di sforzo fisico: reclutamento capillare (meccanismo che avevamo incontrato anche nella circolazione sistemica) e maggiore perfusione, quindi aumento dei flussi dato dall'aumento della gittata cardiaca, e dall'aumento del volume di eiezione del cuore di destra; riduzione delle resistenze periferiche è molto marcata durante l'attività fisica, per cui c'è aumento del flusso senza incremento di pressioni (diversamente da quanto accade nel circolo sistemico) e questo permette una moltiplicazione del volume di sangue che viene a contatto con l'aria alveolare , aumenta la ventilazione, aumenta il numero e la profondità degli atti respiratori, per cui anche in condizioni di sforzo intenso la capacità di ossigenazione dei tessuti viene mantenuta attraverso un miglioramento dello scambio a livello capillare.

Per quanto riguarda l'anidride carbonica il discorso è in parte diverso e questa diversità dipende anche dalla modalità di trasporto dell' anidride carbonica: se fosse integralmente disciolta probabilmente non avremmo queste condizioni di elevata concentrazione anche col basso gradiente a livello alveolo-capillare. L'anidride carbonica ha un'elevatissima diffusibilità (20 volte maggiore della diffusibilità dell'ossigeno) poiché ha una struttura apolare, quindi attraversa le membrane biologiche con un'elevata velocità e si comporta sotto questo punto di vista come il nitrossido, NO, che è in grado di utilizzare il passaggio transmembrana per raggiungere il target molecolare che è la guanilato ciclasi, per determinare così i suoi effetti biologici. L'anidride ha alcuni effetti per certi aspetti analoghi, ma opposti all'ossigeno, in certi distretti vascolari: alta concentrazione di anidride carbonica significa vasocostrizione mentre a livello del circolo cerebrale la CO_2 alta significa vasodilatazione; quindi c'è anche un'attività biologica in funzione di quest'elevata diffusibilità. Però il gradiente si mantiene basso perché la capacità di scambio dell'aria alveolare è limitata dal fatto che per ogni atto respiratorio c'è un parziale ricambio dell'aria alveolare ed è dovuta al fatto che c'è un'elevata stabilità della concentrazione di CO_2 nel sangue dovuta al fatto che buona parte di questa è presente in forma di equilibrio dinamico con l'acido carbonico nella sua forma ionizzata. Quindi il basso gradiente fa sì che con l' alta diffusibilità e il basso gradiente la quantità di scambio sia minore di quanto atteso; quindi la concentrazione di CO_2 nel sangue arterioso è uguale o di poco superiore a quella dell'aria alveolare. C'è uno scambio adeguato, che però è limitato dal basso gradiente di concentrazione dei gas.

A livello del sangue periferico quindi abbiamo una concentrazione gassosa che è quella che giunge ai tessuti senza ulteriori modificazioni sostanziali. A livello dei tessuti noi abbiamo degli scambi che sono la cessione dell'O_2 ,data ancora una volta dagli elevati gradienti di concentrazione, e l'assunzione di CO_2 generata dal metabolismo cellulare che va ad aumentare la concentrazione nel sangue venoso; quindi si crea un circuito con elevati differenziali di concentrazione di O_2, minori differenziali di concentrazione di CO_2 e un'elevata stabilità delle concentrazioni di CO_2 nel sangue.

*(**Emoglobina e funzione respiratoria**)* : La curva di dissociazione dell' emoglobina ha un andamento sigmoide, con una fase con maggiore ampiezza di escursione per valori di concentrazione che sono quelli nell'ambito fisiologico finché si giunge a saturazione.Una saturazione al 100% vuol dire che la capacità di legame, di trasporto dell' Hb è giunta dal punto di vista chimico a saturazione. In questo caso dunque aumentando la concentrazione dell' ossigeno nell'aria respirata non aumenta la capacità di trasporto; quello che si ottiene è invece un aumento della quota di O_2 disciolto (mentre appunto non può aumentare la quota di ossigeno legata all'emoglobina).

Ci sono alcune variabili importanti che determinano uno shift verso sinistra o verso destra della curva di dissociazione. In un ambiente **acido** la dissociazione è facilitata e questo aiuta in condizioni di maggiore utilizzazione di O2 in periferia, ad esempio per aumento del lavoro muscolare oppure per altre condizioni in cui si generi localmente una maggiore acidità. Un viraggio verso l'**alcalosi** modifica la curva di dissociazione rendendo la dissociazione stessa meno facile, quindi con una minore cessione di O2. La **temperatura** alta aumenta la cessione, mentre una bassa temperatura la riduce. La disponibilità di **fosfoglicerato** modifica anch'essa la curva di dissociazione. In condizioni di parziale desaturazione queste variabili diventano importanti per determinare una maggiore o minore cessione di O2 ai tessuti

Trasporto ed estrazione di O2 dipendono da:

- Contenuto ematico in O2, il quale è funzione della quantità di Hb;
- Capacità di distribuzione che è funzione dell'attività cardiaca e dell'equilibrio tra pressioni e flussi a livello del circolo sistemico;
- Capacità di distribuzione a livello dei tessuti che è funzione della capacità di reclutamento capillare e dell'adeguatezza del flusso microcircolatorio;
- funzionalità cellulare che determina una maggiore o minore capacità di trasferimento di O2 alla cellula

(Concentrazione di O2 nel sangue arterioso): In condizioni fisiologiche pressoché tutto l'ossigeno che giunge ai tessuti è veicolato nel sangue attraverso il legame con l'emoglobina.

La capacità di trasporto complessivo di ossigeno è di circa 20 ml di O2 per 100 ml di sangue, di cui la quota imputabile all' Hb è 19,7 ml O2 per 100 ml di sangue con una quantità di trasporto in condizioni di pressione di ossigeno nell'aria respirata pari a quella ambientale di soli 0,3 ml O2/100ml sangue(ndr: 19,7 ml di O2/100 ml di sangue sono associati all' Hb mentre i restanti 0,3 ml O2/100ml di sangue costituiscono la quota disciolta nel sangue). Il numero di globuli rossi e della quantità di Hb in essi contenuta si misurano con l'esame emocromocitometrico, che è una misura della concentrazione nel sangue di eritrociti, del loro volume, della concentrazione di Hb in essi contenuta e delle dimensione cellulari. Quest'insieme di parametri fornisce un' indice della quantità di Hb presente e quindi permette di calcolare qual è la capacità di trasporto dell'ossigeno, poiché quest'ultima è funzione lineare della quantità di Hb. Se ho Hb 15g/dl: se in condizioni fisiologiche dimezzo questo valore, la capacità di trasporto dell'ossigeno si divide per 2(è un'approssimazione perché va considerata anche la quota disciolta).

Questo significa che un maggiore numero di globuli rossi si traduce in una maggiore ossigenazione dei tessuti; la cosa è molto nota agli sportivi che attraverso l'esposizione ad alte quote o altri stimoli come l'eritropoietina determinano un aumento dei globuli rossi e questo automaticamente determina un'aumentata capacità di trasporto. Questo è anche uno dei meccanismi di compenso fisiologico in condizioni d'insufficienza respiratoria ed un meccanismo di adattamento funzionale alla minore capacità di scambio.

Un anemico quindi dovrebbe avere una minore ossigenazione dei tessuti; questo è vero in termini statici (quantità di ossigeno trasportata per unità di volume di sangue è minore) tuttavia si instaurano meccanismi di adattamento cardiocircolatorio e respiratorio che fanno sì che ci possa essere un compenso. Per esempio se con una concentrazione nel sangue di Hb che è la metà di quella iniziale, si raddoppia la frequenza cardiaca, si ottiene in automatico una normalizzazione dei valori di ossigeno trasferiti per unità di tempo ai tessuti. Chiaramente una condizione di anemia determina - per mantenere un' ossigenazione adeguata dei tessuti - una condizione di aumento del lavoro cardiaco, di velocità di circolo, di stroke volume (SV), di gittata cardiaca (GC) perchè

contemporaneamente c'è un'aumentata frequenza cardiaca. Questo perché soprattutto i chemocettori periferici, ma anche quelli centrali, segnalano una bassa concentrazione di O_2 che determina una risposta integrata cardiorespiratoria. Quindi chi ha un' anemia lavora il doppio e ha un miocardio tendenzialmente ipossico : questo può portare a una condizione di scompenso cardiaco ad alta gittata (così come l'ipertiroidismo, dove c'è una dispersione energetica) e ad una riduzione della capacità di adattamento funzionale e quindi la riserva funzionale cardiaca si riduce ampiamente dove esistono le condizioni di anemia.

In termini di variazione della concentrazione di O_2 in soggetti che presentino un' alterazione dello scambio come problema primario, si nota che la riduzione è meno sostanziale perché la saturazione d'ossigeno dal 100% circa delle condizioni fisiologiche passa all'80%, e la riduzione quindi non sarà lineare poiché segue l'andamento della curva di dissociazione; quindi la quantità di O_2 trasferita ai tessuti è proporzionalmente minore, ma non con un deficit così grave come quello che si determina nell'anemia. Anche qui ci sono delle capacità di compenso perché in una situazione di questo tipo la riduzione dell' O_2 determina una risposta adattative cardio-respiratoria,ma la funzione respiratoria potrà funzionare in modo molto modesto come adattamento funzionale. Non può aumentare molto lo scambio se c'è una patologia respiratoria che determina bassi scambi; si potrà avere un piccolo compenso attraverso un aumento dell'attività respiratoria quando possibile e un aumento della frequenza e dell'ampiezza degli atti respiratori. Il meccanismo compensa in piccola parte ma comporta un aumenta del lavoro cardiaco e si determina la condizione che porta allo scompenso, anche perché molto spesso ci sono variazioni delle pressioni nell'albero polmonare, per cui l'ipertensione polmonare che accompagna l'insufficienza respiratoria cronica determina comunque una situazione di scompenso. Quindi entrambe le condizioni sono sfavorevoli dal punto di vista della capacità di trasporto a lungo termine e soprattutto incidono sulla funzionalità cardiaca. La riduzione in termini statici della quantità di O_2 è reale e anche il prelievo di sangue lo conferma però se si considera tutto in modo dinamico ,cioè quanto sangue arriva ai tessuti per unità di tempo, la situazione non è così grave in quanto dipende molto dalla capacità di adattamento cardiaco sottolineiamo ancora una volta come la capacità di trasporto sia strettamente correlata alla capacità di adattamento cardiovascolare).

In più ,in condizioni di questo tipo, si ha sicuramente lo stimolo per il rilascio a livello renale ed epatico di eritropoietina che determinerà un aumento del numero di globuli rossi. Per cui questa riduzione in termini assoluti sarà più modesta, anche su prelievo di sangue, quindi valore statico. La conseguenza diretta di tutto questo è che la distinzione tra una condizione di basso trasporto di O_2 rispetto a una condizione di basso scambio è esplorabile mediante un' emogas-analisi attraverso la valutazione di due parametri: la saturazione in O_2 e la pressione parziale di O_2 (che è funzione non lineare della prima).

In caso di disturbo della capacità di scambi alveolo-capillare, c'è una saturazione di O_2 più bassa, e quindi una pressione parziale di O_2 nel sangue più bassa. In caso di anemia, invece, l'adattamento cardiorespiratorio diventa molto efficiente per cui la saturazione in O_2 dell' Hb sarà sempre molto elevata, prossima al 100% e quindi l'esame emogas-analitico non riconosce una situazione di deficit di trasporto dell'O_2 dovuta all'anemia (esso legge la conta degli eritrociti e la conta in termini di peso della quantità di Hb per unità di volume). L'anemia quindi non è facilmente leggibile perché non riduce, anzi, tendenzialmente migliora la capacità di scambio a livello capillare. Dove esiste un'alterazione di base degli scambi alveolo-capillari, questo è facilmente leggibile perché nel sangue periferico la saturazione dell' Hb con l'ossigeno è più bassa e la quantità di O_2 trasportato, misurato come pressione parziale di O_2 ricavato dal sangue periferico, è più bassa. In entrambi i casi si instaurano dei meccanismi di adattamento per cui la variazione è parzialmente compensata dall'aumento della frequenza cardiaca, aumento della gittata, aumento della velocità di circolo in conseguenza e aumento quando possibile degli scambi alveolari mediante aumento della

ventilazione. Quindi l'anemia ha un pesante impatto sulle capacità di trasporto dell'O2 pur determinandosi delle condizioni che compensano in parte il deficit attraverso l'aumento del lavoro cardiaco. Quando voglio esplorare la funzione respiratoria l'indice più preciso è la saturazione emoglobinica di O2 e quindi la pressione parziale di O2. La ridotta capacità di trasporto nell'anemia viene letta solo dal numero di globuli rossi nessun parametro di indici di trasporto di O2 legge il disturbo di ossigenazione tissutale dovuto all'anemia.

Il Sangue che si è trasferito in periferia deve raggiungere le cellule: per cui c'è necessità che i distretti tissutali periferici abbiano un ottimale rapporto tra cellule e capillari in termini di distanza, perché la capacità di diffusione dei gas è spazialmente limitata. L'ossigeno ha una diffusibilità nello spazio molto limitata per il fatto che è una molecola altamente reattiva e quindi potrebbe interagire con altri substrati danneggiando le cellule; E’ fondamentale che ci sia un'adeguata perfusione nel cosiddetto circolo nutritizio capillare nei singoli tessuti e ovviamente in condizioni di aumentato lavoro del tessuto quindi di consumo energetico del tessuto (muscolo durante l'esercizio fisico) è necessario che ci sia un maggiore reclutamento capillare, un maggiore flusso capillare per avere un'adeguata ossigenazione. Quindi la capacità di adattamento del microcircolo è fondamentale per mantenere l'ossigenazione dei tessuti. All'incirca ci deve essere un flusso che perlomeno non sia inferiore a 300mL/min/m2 (metro quadrato) per poter ossigenare i tessuti in periferia. In caso di stenosi vascolare, per esempio a livello coronarico, a valle c'è un flusso ridotto con pressioni ridotte e la capacità di adattamento è minore perché la capacità di ossigenazione è condizionata dal flusso distrettuale.

Anche alterazioni della distribuzione del flusso capillare possono essere estremamente critiche; nello shock per esempio si determina l'apertura di shunt artero-venosi che bypassano il circolo capillare nutritizio; sostanzialmente il circolo prende delle vie preferenziali e si crea una situazione che è analoga a quella che ha luogo in condizioni di bassa perfusione dovuta a stenosi di una vaso .A livello più periferico, delle arteriole e degli sfinteri precapillari si possono determinare dei passaggi di sangue attraverso circoli preferenziali che bypassano o quantomeno riducono la capacità di variazione del flusso capillare attraverso il reclutamento. Una situazione di questo tipo è presente in molte condizioni, anche nel circolo polmonare. In correlazione a patologie come la cirrosi, una malattia del fegato che determina pesanti ripercussioni sulla perfusione dei tessuti e l'emodinamica sistemica per il fatto che viene modulato in modo abnorme il tono vascolare possiamo vedere una preferenziale vasodilatazione in alcuni distretti vascolari e il risultato che può determinarsi anche a livello polmonare che di regola ha un'elevatissima compliance, è una ridistribuzione dei flussi attraverso circuiti che bypassano i capillari intra-alveolari, quindi il sangue venoso passa come tale nelle vene polmonari e passa nel circolo sistemico. Non c'è nessun disturbo anatomico o funzionale nella ventilazione ma c'è una ridistribuzione dei flussi che determina un bypass del microcircolo capillare intra-alveolare, per cui non c'è ossigenazione dei tessuti. La stessa cosa ma in termini più grossolani avviene anche nell'embolia polmonare, dove viene occluso un ramo o una delle arterie polmonari e quindi si determina un ipoafflusso marcato in un distretto non nutritizio ma di scambio alveolo-capillare per cui non avviene alcun passaggio di O2 dall'aria al sangue. Quindi la distribuzione microcircolatoria è fondamentale perché permette sia a livello polmonare l'ossigenazione ma anche a livello periferico la distribuzione dell'O2 ai tessuti. Nello shock il sangue tende ad essere deviato dal circolo capillare verso quello nutritizio, con un passaggio diretto verso il circolo venoso e questo si può con un prelievo di sangue arterioso da un distretto piuttosto periferico e un prelievo venoso da quel medesimo distretto vascolare si dovrebbe notare sia un gradiente di concentrazione di O2, poiché la concentrazione di O2 è più bassa nel sangue venoso,che un gradiente di concentrazione di CO2, che avrà una maggior concentrazione nel sangue venoso. Se c'è un disturbo del microcircolo (ad esempio per dimostrare lo shock si usa questo test) il sangue arterioso ha una determinata concentrazione di O2 piuttosto ben mantenuta e il sangue venoso mantiene una concentrazione di O2 elevata, quindi c'è stata una bassa estrazione tissutale.

La dimostrazione di una bassa estrazione da parte dei tessuti è la prova che o le cellule sono mal funzionanti, e quindi non sono in grado di estrarre l'O2, oppure che il microcircolo è inadeguato a far giungere l'O2 alle cellule.

Normalmente l'estrazione di O2 è circa il 20-30% del totale: cioè se ho 100 come pressione parziale di O2 nel sangue che giunge ai tessuti, in uscita avrò 70. *(velocità di estrazione tissutale)* Se aumento l'attività metabolica dei tessuti, ad esempio con l'esercizio fisico, la concentrazione di ossigeno nel sangue venoso sarà molto più elevata. Se la quantità di O2 che giunge ai tessuti è inadeguata alle necessità, nel sangue in uscita avrò una concentrazione di O2 molto più bassa. Quindi l'elevata estrazione è spia di un elevato consumo periferico oppure di un' inadeguata perfusione. Soggetti con scompenso cardiaco per esempio hanno una capacità di trasporto dell'O2 più bassa e l'estrazione di O2 in periferia è maggiore (anche senza esercizio fisico) per via delle necessità metaboliche. Quindi se ho 70 in partenza, tolgo una quota fissa che serve per l'ossigenazione dei tessuti in uscita avrò un'estrazione maggiore. Questo è uno dei meccanismi che insieme alla stasi venosi generano uno degli aspetti dello scompenso cardiaco congestizio e cioè la comparsa della cianosi periferica, cioè l'evidenza di una minore ossigenazione nel sangue perché c'è più Hb desaturata. Quindi posso avere elevata estrazione perché i tessuti lavorano tanto e l' apporto di sangue è adeguato, ma se ho un'elevata estrazione del sangue dai tessuti significa che l'apporto sanguigno era carente e inadeguato e quindi o c'è una condizione di ischemia o di relativa ipoperfusione per cui si ha un deficit di ossigenazione. Un'elevata estrazione in condizioni base, è quindi un segno di patologia. Il deficit di ossigenazione compromette la funzionalità cellulare e questo spiega ad esempio nello scompenso cardiaco quella quota di deficit di forza muscolare che accompagna sempre lo scompenso cardiaco e spiega anche la comparsa del dolore nel tessuto ischemico perché l'ipossia tissutale è uno dei meccanismi di trigger della risposta dolorosa attraverso il rilascio di mediatori.

C'è un' elevata capacità di adattamento funzionale: in condizioni di flusso aumentato per l'esercizio fisico, in flusso ridotto per stenosi di un'arteria coronarica, ci sono meccanismi di adattamento per cui se si consuma poco O2 in periferia non si risente di queste variazioni di trasporto. Però se dovessimo aumentare l'attività fisica ci sarebbe una situazione critica perché la quantità di O2 necessaria sarebbe insufficiente: come anche per esempio in condizioni di ischemia miocardica o in condizioni shock (in cui c'è un circolo che va attraverso bypass artero-venosi funzionali saltando il circolo capillare) si determina un'ipoperfusione tissutale che determina una compromissione della funzionalità cellulare. Si ha quindi una condizione di ipossia periferica che porta alla lunga alla morte cellulare e comunque a un deficit di funzionalità. Anche se ho una caduta di pressione la funzionalità cardiaca viene mantenuta, ma se ho una massiva dilatazione (shock), emergono le stesse condizioni perché la capacità di trasporto dipende non solo dalla funzionalità cardiaca, ma anche dal circolo sistemico; quindi tutte le variabili che incidono sul trasporto dell'O2 (funzionalità cardiaca, quantità di Hb, pressione arteriosa, struttura del microcircolo e flussi microcircolatori) possono condizionare pesantemente e in modo critico, la funzionalità cellulare.

(Trasporto della CO2): la pressione di CO2 nell'aria atmosferica è bassissima, nell'aria alveolare è invece molto alta, simile a quella che c'è nel circolo sanguigno, sia nel distretto arterioso che in quello venoso. Questo accade perché la CO2, che ha un'elevatissima diffusibilità, giunge nel circolo sanguigno per un gradiente di concentrazione e qui viene veicolata attraverso un complesso sistema: una piccola quota è disciolta; una quota è legata all'Hb, ma non al sito catalitico dell' heme, quindi non va a competere con l'ossigeno (cosa che invece fa il monossido di carbonio CO e in parte anche l'ossido d'azoto NO, però le concentrazioni di NO sono di ordini di grandezza molto più bassi, quindi per misurare la quantità di NO si mette Hb ridotta e si vede se NO va a legarsi al posto dell'O2). Quindi CO2 lega Hb non in corrispondenza dell' heme ma a livello della struttura proteica. Nonostante ciò, però, c'è una sorta di legame tra concentrazione di O2 e di CO2, nel senso che

aumentando la concentrazione di O_2, la capacità di legame della CO_2 si riduce e viceversa. Questo accade perché probabilmente si creano delle modificazioni della struttura quaternaria dell' Hb che fanno sì che si crei una sorta di effetto Bohr, per cui variando la concentrazione dell'uno o dell'altra si favorisce il distacco di uno e dell'altro; questo spiega in parte la maggiore diffusibilità a livello alveolo-capillare e in periferia dei due gas. Questa è una quota che può arrivare al 20%. Gran parte della CO_2 è trasferita in una molecola che si pone in equilibrio dinamico con la CO_2 e con la forma ionizzata che è l'acido carbonico; questo avviene perché ci sono diverse enzimi ampiamente espressi in molte isoforme in numerose cellule (compresi gli eritrociti) in cui la reazione viene spostata verso destra nella direzione per cui si passa dalla CO_2 alla produzione di acido carbonico. La reazione avverrebbe in modo molto meno massivo se non ci fosse l'attività enzimatica che facilita la reazione. La reazione può avvenire anche nel senso opposto: nel tubulo renale è importante l'azione dell'anidrasi carbonica per determinare la formazione di acido carbonico e di ione bicarbonato, oppure per determinare la dissociazione in CO_2 e acqua.L'acido carbonico e lo ione bicarbonato sono il principale sistema tampone che permette nell'ambiente extracellulare di mantenere entro un limite fisiologico il pH. Questo rende ragione anche dell'elevata stabilità in termini di concentrazione della CO_2 in tutto il circolo sanguigno. La CO_2 è una sorta di patrimonio che viene preservato ed ha un range di variazione abbastanza ristretto, perché sopra i 70mmHg di pressione parziale di CO_2 si hanno effetti neurotossici (sopore, fino al coma). Se invece la concentrazione scende molto, si hanno condizioni per cui viene mal regolato sia l'equilibrio acido-base e che la funzionalità respiratoria. Questo accade perché i chemocettori centrali sono sensibili alla concentrazione idrogenionica a livello del liquor. La concentrazione di idrogenioni è espressione a sua volta della concentrazione di ione bicarbonato e della concentrazione di acidi. Allora in condizioni di acidosi o di incremento della concentrazione di CO_2, e quindi di conseguenza di ioni bicarbonato e liberazione di idrogenioni, si determina attraverso la stimolazione preferenziale dei chemocettori bulbari un incremento dell'attività respiratoria,un aumento della profondità e del numero degli atti respiratori, che determineranno quindi una risposta adattativa cardiorespiratoria, (respiro particolarmente ampio in condizioni di acidosi).

Un altro sistema di adattamento funzionale della respirazione è la quantità di O_2 che viene sentita in modo particolare a livello dei chemocettori localizzati a livello del bulbo aortico. La sensibilità dei chemocettori periferici è molto preferenziale per la concentrazione di O_2; infatti anche se c'è una certa sensibilità per la concentrazione di ioni idrogeno, la soglia di risposta è particolarmente spostata verso variazioni della concentrazione di O_2 in periferia, per cui la risposta adattativa cardiorespiratoria che si instaura in una variazione della concentrazione di O_2 è preferenzialmente determinata dalla stimolazione dei chemocettori periferici. L' attività respiratoria in condizioni fisiologiche è molto determinata dall'attività dei chemocettori localizzati in aree piuttosto diffuse a livello bulbare. Quindi c'è un duplice trigger che in buona parte delle condizioni è sincrono perché quando scende O_2 di solito aumenta CO_2, però ci sono delle condizioni in cui la cosa può essere totalmente dissociata. Ad esempio in alta quota, ed anche in altre condizioni si instaurano specifici meccanismi. Se si riduce la concentrazione di O_2 nell'aria respirata, c'è uno stimolo molto intenso per l'attività cardiorespiratoria: aumenta la frequenza cardiaca (per trasferire O_2 in quantità adeguata ai tessuti), si ha un adattamento del circolo periferico con una tendenziale vasocostrizione, se la CO_2 scende molto si ha una vasodilatazione. Tuttavia nel primo caso la vasocostrizione è data dal sistema adrenergico, nel secondo caso ci sono dei meccanismi più legati all'ipossia stessa. A livello del circolo polmonare ho una vasocostrizione e ci sono potenti stimoli per l'attività respiratoria e così gli atti respiratori diventano più intensi e più frequenti. Il risultato è che essendo la capacità di scambio alveolo-capillare mantenuta, si riesce a trasferire più O_2 verso il sangue e verso i tessuti, però allo stesso tempo c'è marcata riduzione della concentrazione di CO_2. Questo accade perché aumentando la ventilazione polmonare, si determina un maggiore gradiente di concentrazione di CO_2 tra capillare e alveolo e quindi la concentrazione di CO_2 nel sangue decresce. Decrescendo questa, si determina una riduzione della concentrazione di bicarbonati quindi

insorge un' alcalosi di tipo respiratorio che favorisce dei fenomeni associati come ad esempio una minore quota di calcio libero e in base a questo si determinano una serie di eventi che caratterizzano per esempio il "mal di montagna", cioè uno stato di alterazione della funzione cognitiva e uno stato di sopore, nausea e una serie di alterazioni legate al disturbo acido-base a livello del SNC, alla bassa concentrazione di CO_2 e fenomeni di contrazione tetanica dovuti al fatto che la quota di calcio libero, ionizzato, si riduce.

La stessa cosa può accadere anche in condizioni di embolia polmonare oppure in polmoniti. Nell'embolia polmonare c'è una minore perfusione, quindi la capacità di scambio a livello alveolo-capillare si riduce, c'è ipossia periferica e c'è lo stimolo per un'attività respiratoria più intensa, però nel parenchima polmonare residuo non è alterata la capacità di scambioquindi in molti distretti capillari la capacità di scambio è mantenuta,aumentando l'attività respiratoria, aumento l'eliminazione di CO_2. Molto spesso si riesce anche a compensare, per cui la riduzione di O_2 è molto modesta, ma è compensata da un'elevata attività respiratoria, però ancora una volta determina le condizioni di una bassa concentrazione di CO_2 perché una quota maggiore viene eliminata e quindi si determinano le condizioni che portano ad alcalosi respiratoria. Viene molto usata l'emogas-analisi (anche se in modo improprio perché non è diagnostica) per dimostrare una condizione (come quella appena descritta) di embolia polmonare. E' un uso improprio perché anche in caso di situazione di ansia (esempio: esame) aumenta l'attività respiratoria e dall'analisi con emogas-analitico risulta una saturazione dell'ossigeno altissima, un trasporto ai tessuti -compreso il cervello- molto aumentato e questo è positivo. Però ci sarà anche una bassa concentrazione di CO_2, alcalosi respiratoria e di conseguenza malessere, nausea ecc.

Una situazione di ipossia che determini una ipocapnia in tempi abbastanza ristretti in condizioni fisiologiche determina un arresto della respirazione perché lo stimolo dei chemocettori sensibili agli idrogenioni viene a mancare e quindi c'è un arresto, dell'attività respiratoria. Se si comincia una ventilazione forzata su base volontaria dopo circa venti atti respiratori si è obbligati a cessarla perché si instaura una situazione di alcalosi respiratoria. Il tempo di trasferimento dell'informazione dal sangue alle cellule dei chemocettori bulbari più o meno specializzate come sensori della concentrazione di idrogenioni è temporalmente protratto perché occorre una modificazione della concentrazione di idrogenioni nel liquor, quindi non è istantaneo, com'è invece la variazione della concentrazione di O_2 nel dettare l'incremento dell'attività cardiorespiratoria. Quindi si possono creare delle situazioni, soprattutto nell'insufficienza respiratoria cronica, in cui l'attività dei due sistemi di controllo si dissocia e quindi si crea una situazione di alterazione dell'attività respiratoria spontanea.

Quando ci sono condizioni come l'esercizio fisico, l'iperpiressia, o altre situazioni che determinano maggiore consumo di ossigeno, si ha l'attivazione di una risposta adattativa. Spesso ci può essere tendenza all'alcalosi respiratoria, però il viraggio verso l'alcalosi viene interrotto dal fatto che molto spesso si instaura una condizione di acidosi periferica tissutale di tipo metabolico. In una condizione di questo tipo, pur in presenza di una riduzione della CO_2, raramente si determina una situazione di alcalosi franca perché queste condizioni sono molto spesso o sempre associate a un'acidosi metabolica, per cui i bicarbonati si riducono, ma il pH non sale.

Un'ipossia associata a una patologia della ventilazione o dello scambio alveolo-capillare, si accompagna spesso a una necessaria ipercapnia. Quindi ci sarà una condizione in termini di variazione del pH di viraggio verso l'acidità perché aumenta -in funzione dell'incremento di CO_2- la quantità di ione bicarbonato e quindi si generano idrogenioni che fanno scendere il pH ematico. Avrò però un accumulo di bicarbonato e questo è caratteristico delle insufficienze respiratorie e avviene proprio perché insieme all'ipossia c'è molto spesso anche l'ipercapnia, la quale può essere

determinata dalle condizioni sopra descritte oppure da una bassa capacità di trasporto (come nello scompenso cardiaco ad esempio).

Quindi l'anemia e l'intossicazione da CO riducono la capacità di trasporto ed anche qui si ha una situazione di ipossia periferica ,non legata alla condizione respiratoria, e quindi nell'anemia c'è ancora una tendenza all'alcalosi.Nell'intossicazione da CO la situazione è un po' più complessa perché il legame di CO all'eme determina un mascheramento dello stato di ipossia.

(Risposta tissutale all'ipossia cronica): Nel caso di insufficienza respiratoria cronica si registra la comparsa del cosiddetto **respiro periodico,** che è dato dal fatto che se c'è una perenne condizione di ipossia per cui si determina un adattamento, un resetting dei chemocettori, che porta all'instaurarsi di una maggiore tolleranza alle condizioni di ipossia. Peraltro un fumatore è maggiormente tollerante all'intossicazione da CO perché tende ad avere un adattamento funzionale nel trasporto, nell'estrazione, per cui i fumatori sono quelli che tendono a sopravvivere alle intossicazioni collettive da CO mentre i primi a morire sono i bambini. La stessa cosa avviene nelle insufficienze respiratorie croniche: c'è una maggiore tolleranza all'ipossia. Infatti i soggetti con insufficienza respiratoria cronica in fase avanzata ha perennemente la saturazione di O_2 prossima all'80% o poco superiore (comunque concentrazioni di O_2 nel sangue sono considerate buone, sufficienti, quando superano il 60-65%). Allo stesso tempo c'è una disregolazione dei chemocettori centrali per la CO_2. Il risultato è che l'attività respiratoria diventa molto dipendente dalle variazione della concentrazione di O_2; quest'ultima deve scendere moltissimo perché si abbia lo stimolo ad un'intensa attività respiratoria. Ne deriva che l'attività respiratoria tende ad essere molto variabile, in un range piuttosto ampio. Se al tempo zero un soggetto è in apnea, non comincia un'attività respiratoria adeguata finché la concentrazione di CO_2 nel sangue non scende molto; a questo punto parte un'attività respiratoria molto intensa che non viene compensata perché anche se diminuisce la concentrazione di CO_2, questa deve diminuire moltissimo per poter dare un segnale inibitorio. Mentre le due variazioni tendono normalmente ad essere sincrone - si riduce un po' l'O_2, parte il segnale e c'è anche una concentrazione di idrogenioni abbastanza stabile, per cui tutto viene mantenuto in un ambito abbastanza ristretto - in un soggetto che abbia questa sorta di desensibilizzazione dei chemocettori si determina che l'ampiezza delle variazioni dell'attività respiratoria aumenta molto, per cui in base all'ipossia aumenta l'attività respiratoria in modo molto intenso.

Il respiro periodico è caratteristico delle forme più avanzate di bronchite cronica. Adesso lo si vede meno perché si interviene il prima possibile con il supporto cronico con l'ossigeno oppure con ventilazioni meccaniche esterne in modo da non arrivare a queste condizioni.

Quando scende moltissimo la concentrazione do O_2 inizia un'attività respiratoria molto intensa, aumentano la frequenza e l'ampiezza degli atti respiratori. Quando scende invece molto la concentrazione di CO_2 si arresta l'attività respiratoria e questo determina una ridiscesa della concentrazione dell'O_2, e così via per ogni ciclo respiratorio. I cicli durano all'incirca 30 secondi, poco meno. Questo significa che c'è una bassa sensibilità chemorecettoriale per cui l'ampiezza delle variazioni degli atti respiratori diventa molto ampia e di conseguenza l'attività respiratoria si fa molto irregolare. Vedere un respiro di questo tipo permette di dire che c'è una condizione di insufficienza respiratoria cronica di tipo ipercapnico e ipossico.

Nell'ipossia cronica c'è un notevole adattamento dei tessuti alla condizione di ipossia. Si hanno degli adattamenti non favorevoli perché il cuore lavora in condizioni ipossiche, e quindi funzionalmente è meno adatto; l'ipossia inoltre determina vasocostrizione del circolo polmonare e quindi un aumento delle resistenze vascolari intrapolmonari. Bisogna tener presente che in un soggetto che passa da uno stato di benessere a una condizione anche acuta di polmonite o di

bronchite di tipo cronico può determinare un'alterazione della pressione in arteria polmonare, normalmente ampiamente inferiore a 20 cmH2O, che si spinge così verso 70-80 (cmH2O). Quindi è un incremento importante delle resistenze al flusso quello che si determina nelle forme acute (acute perché l'aspetto di vasocostrizione è molto importante in questi casi) ed anche croniche. I tessuti si adattano a una minore ossigenazione, a una minor capacità di riserva funzionale Infatti il muscolo sottoposto al lavoro esaurisce prima la capacità di respirazione aerobica, per cui si va in acidosi metabolica molto rapidamente.

Alcuni adattamenti all'ipossia cronica sono tipici: primo fra tutti è l'aumento del numero di eritrociti nel sangue. Se si va in alta quota, infatti, il midollo dopo circa 3 giorni comincia a produrre eritrociti in numero maggiore e questo compensa -attraverso un aumento della quantità di Hb per unità di volume- il deficit di O2. Il compenso è spesso adeguato. Se il soggetto torna a pressioni atmosferiche più alte, avrà una capacità di trasporto dell'O2 migliorata, quindi una performance fisica molto migliore. Il soggetto con insufficienza cronica respiratoria ha lo stessi tipo di alterazione, nel senso che è cronicamente ipossico quindi si comporta come se si trovasse in alta quota e produce più globuli rossi. Tuttavia variando la concentrazione dei globuli rossi cambia la viscosità ematica: parametro che pesa pochissimo. Diventa rilevante quando si riducono i globuli rossi, nell'anemia la viscosità ematica si riduce, e quindi le resistenze vascolari periferiche si riducono e i flussi ematici occorrono a pressioni e a volumi diversi rispetto a quelli a cui avvengono fisiologicamente. Quindi si hanno più alti flussi con minori resistenze. In condizioni di ipossia cronica da insufficienza respiratoria l'aumento della viscosità genera un ulteriore incremento delle resistenze del circolo polmonare, un ulteriore incremento del lavoro cardiaco e quindi fornisce una componente in più nel determinare lo scompenso cardiaco, nonostante funzionalmente serva a determinare un maggiore trasporto di O2.

- Quindi nell'insieme nell'insufficienza respiratoria, e soprattutto nell'ipossia cronica, compaiono fenomeni quali **vasocostrizione polmonare**, ipertensione polmonare e quindi cuore polmonare;
- a livello del **muscolo scheletrico** si ha bassa generazione di ATP, riduzione della capacità di svolgere lavoro muscolare in presenza, molto spesso, di un aumento del lavoro muscolare necessario per l'apertura della cassa toracica. Quindi paradossalmente sono soggetti che hanno una minore capacità di lavoro muscolare, ma sono costretti in condizioni di riposo a svolgere un maggiore lavoro muscolare. Quindi c'è una maggiore riserva funzionale respiratoria che è condizionata anche dalla capacità di mantenere il lavoro muscolare. Una condizione di grave dispnea, se non corretta, porta a morte anche per esaurimento della forza muscolare.
- Il **fegato** subisce dei danni, ma di solito non si tratta di danni di tipo parenchimale, si instaura invece un'alterazione della capacità funzionale e quindi della sintesi proteica.
- Il **cuore** lavorando in condizioni di ipossia avrà una contrattilità minore e questo spiega anche la progressione rapida della insufficienza cardiaca e la possibilità che si instauri una condizione di ischemia miocardica quando ci sia associata una condizione di deficit di flusso coronarico.

INSUFFICIENZA RENALE:

L'aspetto anatomofunzionale nel rene è estremamente integrato. Il rene svolge una duplice funzione: regola i volumi, ovvero il patrimonio idrico, e regola il patrimonio salino; inoltre svolge la funzione di emuntore, ovvero è implicato nell'eliminazione di molte sostanze che vengono generate quotidianamente nell'organismo, ma devono essere eliminate, senza che si accumulino.

Dal punto di vista strutturale si riconoscono il glomerulo, che svolge una funzione di filtrazione, e il tubulo, dove avvengono fenomeni di scambi di sodio e bicarbonato e di molti altri soluti. Si riconosce funzionalmente une porzione prossimale, definita anche dal punto di vista anatomico perché collocata nella corticale, dove avviene un elevatissimo riassorbimento di soluti.Il tubulo si approfonda nella midollare ed è in stretta connessione fin dalle porzioni iniziali dello stesso (quindi a livello di tubulo post-glomerulare) con la porzione di circolo rappresentata dai vasa recta, che scendono nella midollare e fungono da accettori delle sostanze che vengono riassorbite.

Nella midollare c'è una sorta di ambiente specializzato dove si genera un gradiente di concentrazione di sodio nell'ambiente interstiziale, per cui si va a generare una sorta di stratificazione delle concentrazioni di sodio, che sono crescenti via via crescenti man mano che ci si avvicina alla papilla. Il mantenimento di questo gradiente dinamico di concentrazioni di sodio, che però è stratificato, è possibile perché grazie al meccanismo del funzionamento controcorrente dell'ansa di Henle, dove c'è una porzione che riassorbe il sodio nel tratto ascendente, e dove invece si ha il passaggio di acqua nel tratto discendente. Questo meccanismo determina un progressivo incremento della concentrazione del sodio via via che si approfonda il tubulo, ed una progressiva diluizione nel tratto ascendente perché avviene un riassorbimento di acqua. Questo genera una stratificazione della concentrazione di sodio anche nell'interstizio. Il mantenimento di questo sistema controcorrente serve a modificare la concentrazione dei soluti e a recuperare una quota di acqua ulteriore. Si arriva quindi al tubulo convoluto distale nella corticale renale dove agiscono dei trasportatori per il sodio che modulano ulteriormente il riassorbimento di sodio. Questa capacità di trasporto del sodio è proporzionalmente molto minore rispetto a quella del tubulo (contorto) prossimale, dove avviene circa il 65-70% del riassorbimento di sodio;mentre il 25% è riassorbito in questa sede; qui siamo al 10% del totale che viene. Questo riassorbimento avviene in una condizione in cui non c'è modulazione sostanziale dei volumi. Quindi nel tratto distale la quantità di sodio presente rispetto a quella che era stata ultrafiltrata è circa il 3%; qui agisce una regolazione mediata dell'aldosterone, che determina quello che si chiama il fine riassorbimento del sodio, che determina la quantità di sodio che sarà presente nelle urine. Se si considera che la fine regolazione è quella che determina la quantità di sodio nelle urine ed è determinata dall'aldosterone, risulta molto evidente il significato funzionale dell'asse renina-angiotensina-aldosterone. Se c'è bassa perfusione renale, bassi volumi, e molto spesso bassa concentrazione di sodio, la liberazione dell'aldosterone determina una quota di riassorbimento maggiore quando ci sia alto volume e minore quando ci sia basso volume. L'aldosterone si libera quando c'è basso volume. L'obbiettivo è compensatorio, di recuperare maggiormente o far perdere di più (in base alle condizioni di perfusione e volumi).

Il risultato è che in una condizione di ipoperfusione renale quello che si determina è che la filtrazione viene modulata in modo da essere ottimizzata e il riassorbimento di acqua e di sodio viene ottimizzato in modo che virtualmente tutto il sodio presente nel tubulo venga riassorbito.

Diverso è per le altre sostanze: le sostanze che devono essere eliminate ovviamente non sono filtrate dal glomerulo e non sono sottoposte a un riassorbimento tubulare però può accadere che il loro accumulo si determini perché la filtrazione si riduce oppure che ci sia un ostacolo al passaggio del fluido attraverso il tubulo. Quindi l'alterazione della funzione di filtrazione o l'alterazione dell'eliminazione dei soluti possono essere cause di un accumulo di sostanze come avviene nell'insufficienza renale.

Dal punto di vista funzionale il rene svolge egregiamente la sua funzione con un'ampia riserva funzionale (il concetto di riserva funzionale l'abbiamo anche incontrato nel sistema respiratorio e nel sistema cardiovascolare). La riserva funzionale del rene è data dal fatto che circa un sesto del volume di sangue che viene gettato in avanti dal cuore finisce nella circolazione renale. Dal punto di vista funzionale l'elevata capacità di adattamento è data dal numero elevatissimo di nefroni e di

glomeruli; quindi la capacità di avere un apporto sanguigno adeguato e la capacità del rene di mantenere un'adeguata perfusione nel distretto corticale, anche in condizioni di bassa perfusione, fanno sì che la funzionalità glomerulare possa essere preservata e mantenuta costante in un ampio range di pressioni e di variazioni di flusso.

Tuttavia c'è un limite alla capacità di adattamento funzionale renale, quando questo limite viene superato insorge la condizione di insufficienza renale. L'altro aspetto dell'elevata adeguatezza è che il sistema è perfettamente adattabile alle variazioni di flusso e di pressione ed è in grado attraverso la funzione tubulare di determinare un equilibrio nei volumi in condizioni di amplissima variazione. Infatti si possono bere fino a circa 20L di acqua al giorno ed il rene riesce teoricamente a mantenere un equilibrio di volumi. Si può restringere l'introito idrico in condizioni fisiologiche in un rene normofunzionante fino a 500mL al giorno e riesco a eliminare tutti i soluti generati dall'organismo, senza variazioni. Allo stesso tempo riesco a mantenere anche il bilancio idrosalino. Quindi la funzione tubulare è estremamente regolata ed è fondamentale per mantenere il bilancio.

Uno degli aspetti anatomofunzionali molto importanti è che pur essendo il tubulo renale una struttura che per funzionare ha bisogno di un alto consumo energetico, di un alto trasporto di O_2,si trova in una condizione particolare - in virtù della struttura anatomica - per cui si ha un gradiente di tensione di O_2 decrescente dalla corticale alla midollare. In condizioni fisiologiche questo è poco rilevante, però è evidente che se io sono in una condizione di relativa ipossia oppure sono in una condizione di deficit di trasporto di O_2, le porzioni più interne del rene saranno esposte con grande facilità a una sofferenza ipossico-ischemica. Tutta l'architettura renale è tale da permettere un adattamento circolatorio migliore nella porzione corticale, soprattutto nella cosiddetta corticale interna, per cui in condizioni di ipoperfusione renale la diversione del flusso verso la corticale interna permette di mantenere una filtrazione glomerulare (nella corticale interna sono collocati i glomeruli di più grosse dimensioni con un tubulo relativamente più breve per cui sono più adatti a sopperire alle funzioni di filtrazione in caso di ipoperfusione). Nella midollare invece la capacità di adattamento è minima quindi il rene in molte condizioni è esposto a condizioni di danno ipossico ischemico. Questo tipo di condizioni sono rappresentate dall'insufficienza respiratoria, dall'insufficienza cardiaca, dall'anemia e dalle condizioni di ipotensione arteriosa.

La funzionalità renale è mantenuta da un equilibrio che avviene a livello del filtrato glomerulare e a livello del tubulo. Ci possono essere delle condizioni esterne alla struttura del rene in cui si determina una minore perfusione del rene, un minore trasporto di O_2 - e questo è importante - e in termini assoluti una minore capacità di nutrizione e una perfusione più bassa.

Le condizioni sono molto frequenti, l'insufficienza cardiaca è la prima tra tutte, e questo evoca una risposta adattativa funzionale che permette entro certi limiti di preservare la funzione. Però se la perfusione renale decresce oltre quello che è definito il limite di autoregolazione renale, viene persa la capacità di adattamento funzionale e il rene va in una condizione di inadeguatezza, di insufficienza renale che per genesi non è renale, e viene quindi definita pre-renale, e ha una modalità di insorgenza acuta. Quindi il rene, per la sua struttura anatomica, per le sue caratteristiche intrinseche, è soggetto ad essere molto sensibile alle variazioni del circolo sistemico, della performance cardiaca, dell' ossigenazione della capacità di trasporto e di scambio.

Ci sono invece condizioni di malfunzionamento renale che sono dettate da una alterazione strutturale del glomerulo, come per esempio nel caso delle glomerulonefriti (abbiamo già visto nell'ipertensione arteriosa che si può determinare una danno vascolare anche nel glomerulo), oppure dovute a un danno del tubulo: ad esempio l'ipossia stessa può determinare una necrosi tubulare, poiché, avendo il rene questa funzione di filtrazione, espone le cellule tubulari ad un'elevata concentrazione di sostanze potenzialmente tossiche. Pensiamo in questo caso ai farmaci, che

giungono intatti al rene e possono esplicare la loro azione tossica nel tubulo perché lì raggiungono elevatissime concentrazioni; anche i metalli pesanti costituiscono una tipica causa di danno tubulare. Queste condizioni determinano un'insufficienza di funzione renale che è in sé determinata da un'alterazione della struttura e funzionalità del rene, quindi è indipendente dal circolo; il circolo può essere ottimale ma se io ho assunto un farmaco che si concentra nel rene e lì esplica una funzione tossica, il danno c'è ed è un danno renale. Quindi si crea una situazione di insufficienza cosiddetta renale, o parenchimale, o intrinseca.

Il rene svolge la sua funzione, elimina i soluti nelle urine e queste vengono poi eliminate attraverso le vie urinarie (quindi pelvi renale, ureteri, vescica e uretra). Però se si genera un ostacolo al flusso urinario a valle del rene, si determina una condizione che porta ad insufficienza renale però i reni sono due, quindi questo avviene se si ha un impegno delle vie comuni oppure comunque simmetrico. In queste condizioni infatti si modificano dei parametri che regolano la funzionalità renale in funzione della pressione intra-tubulare. Quindi ogni ostacolo al flusso dell'urina fuori dal rene può determinare una cosiddetta insufficienza renale post-renale. Il rene è funzionalmente normale, ma se chiudo lo sbocco dell'uretere in vescica, come accade per esempio nel caso di una neoplasia che interessi la vescica e chiuda gli ureteri, si determina un ostacolo al flusso urinario, che determinerà di per sé un arresto della funzione di filtrazione.

L'insufficienza renale viene definita sulla base di alcuni criteri che indicano un'alterata funzione (quindi che non vanno a distinguere la genesi) e il parametro che più rispecchia lo stato di insufficienza funzionale è la filtrazione glomerulare, perché qualsiasi sia il meccanismo. Quindi quello che legge meglio la funzione renale sono proprio gli indici di filtrazione. La creatininemia è il parametro di riferimento per questo.

Sbobinatore:Dzenete Kadrija

Supervisore: Maria Silvia Varalta

Lezione di Patologia generale e fisiopatologia clinica (sem2) del 15/4/2013 (1)

Sbobinatore: Sofia Corradin

Professore: Cassatella

Lezione di Patologia del 15-04-2013

(*La registrazione è iniziata qualche secondo dopo la lezione quindi mancano le prime parole del discorso.*)

La **proliferazione incontrollata** da parte delle cellule tumorali dipende dal fatto che i controlli sulla proliferazione, che normalmente esistono, o sono completamente persi oppure sono molto carenti per cui la cellula continua a proliferare.

Ne risulta una popolazione cellulare genotipicamente o fenotipicamente estranea perchè man mano che questo clone cellulare prolifera cambia faccia e si comporta come un estraneo nei confronti dell'ambiente per comportamento, sviluppo, proliferazione e differenziazione; nel caso di tumori maligni instaura un **rapporto portale** con l'ospite. Dei tumori benigni ne parleremo in seguito.

L'accrescimento neoplastico è nella quasi totalità dei casi un **processo irreversibile** e quindi indefinito nello spazio e nel tempo.

Quindi la cellula tumorale è una cellula "impazzita" che perde tutti i controlli interni e anche dell'ambiente per cui comincia a proliferare infinitamente e subisce anche un **blocco della differenziazione** a causa delle **alterazioni genetiche** che accumula nel tempo e che fanno acquisire

caratteristiche che aumentano, perpetuano e aggravano questa crescita.

(Diapositiva 2)

NEOPLASIA

(Diapositiva 3)

Una **neoplasia** è una crescita tissutale progressiva e relativamente autonoma.

E' una crescita o proliferazione cellulare che fa **aumentare nel tempo la malignità** della cellula.

Quindi, secondo questo concetto, è il più grave dei processi patologici a carico della proliferazione e della differenziazione (le alterazioni omeostatiche infatti riguardano questi due processi.)

<u>Processi patologici riguardanti la proliferazione</u>:

(*Diapositiva 4*)

Ci sono altri processi patologici che riguardano una modificazione della proliferazione, per esempio l'**iperplasia** che è l'aumento del volume di un tessuto legato ad un aumento del numero delle cellule causato da proliferazione.

L'**ipertrofia (**il suo opposto è l'**ipotrofia** – **atrofia)** consiste in un aumento di volume e di massa di un organo dovuto ad alterazioni molecolari delle cellule che causano un aumento del volume di esse.

Quindi l'aumento di una massa di un organo può essere dovuto a iperplasia se aumenta il numero di cellule o ipertrofia se aumenta il volume delle cellule.

Questi sono **processi reversibili** al contrario delle neoplasie che invece sono processi patologici irreversibili.

(*il prof. dice che ci sarebbe una lezione intera da fare su questi argomenti per cui consiglia di studiarli da un libro di testo*).

Processi patologici non neoplastici riguardanti la differenziazione:

In parte sono le **metaplasie** ovvero un'alterazione della differenziazione di una cellula nell'ambito di uno stesso foglietto germinativo. Per esempio, una cellula epiteliale che dovrebbe evolvere verso una cellula epiteliale cubica o ciliata diventa invece una cellula epiteliale squamosa.

Poi abbiamo le **anaplasie**, che riguardano anche i tumori, ovvero un'alterazione dello stato differenziativo che fa in modo che l'istologia di una cellula non sia più riconoscibile. Vedremo che in realtà l'anaplasia è una delle caratteristiche proprie delle cellule tumorali maligne che sono altamente indifferenziate (infatti quando l'anatomopatologo non è più in grado di riconoscere l'origine della cellula si parla di cellula anaplasica).

E poi la **neoplasia** che è una nuova crescita di cellule e consiste in un blocco differenziativo associato ad una proliferazione incontrollata.

(*Diapositiva 5*)

Alla base della proliferazione dei tumori, come tutti sanno, ci sono delle alterazioni genetiche. Quindi a livello molecolare in realtà i tumori derivano da **alterazioni genetiche o epigenetiche**.

Le alterazioni genetiche coinvolgono la struttura, tramite delle mutazioni, o la regolazione dell'espressione di alcuni geni che sono implicati nella proliferazione e nella differenziazione.

Quindi queste alterazioni causano un **cambiamento della struttura e della funzione della proteina** codificata da quel gene. La proteina è quindi alterata, mutata, iperattiva ecc..

(Diapositiva 6)

(il professore sostanzialmente legge la slide e approfondisce alcuni punti. I numeri qui di seguito si riferiscono ai numeri che si trovano nella slide)

<u>Prove e osservazioni che indirizzano verso una patogenesi genetica dei tumori:</u>

1. le cellule tumorali maligne sono facilmente riconoscibili in un tessuto perchè l'anatomopatologo osserva **anomalie nella forma, dimensione e colorabilità del nucleo** e anche della mitosi delle cellule.
2. un tumore nasce nel 99,9% dei casi dall'**alterazione di una cellula** (cancerogeni, radiazioni, virus, malattie ereditarie); un **clone cellulare** che inizia a proliferare e che accumula una serie di alterazioni genetiche che poi vengono **trasmesse alle cellule figlie**.
3. **malattie ereditarie** che presentano determinati sintomi clinici e che a livello molecolare sono causate per esempio dalla mancanza di enzimi che riparano il DNA **aumentano il rischio di sviluppare delle neoplasie**.
4. All'inizio si è dimostrato che il **DNA di una cellula neoplastica è in grado di indurre la formazione di un tumore in vitro** se trasfettato in una cellula sana. Poi si è dimostrato la caratteristica oncogenica di geni prelevati da tumori spontanei o sperimentali.

(Diapositiva 7)

I geni responsabili della trasformazione neoplastica sono tanti in realtà.

I più conosciuti sono gli **oncogeni** e i **geni oncosopressori** detti anche **antioncogeni**.

(Diapositiva 8)

I **proto-oncogeni** sono geni **già presenti nelle cellule sane** che codificano per proteine che normalmente sono coinvolte nell'**attivazione della proliferazione**.

Gli **oncogeni** derivano dall'alterazione o mutazione dei proto-oncogeni (geni importanti per il controllo della proliferazione cellulare). L'alterazione della loro funzione può contribuire a un'alterazione neoplasica.

I **geni oncosopressori** sono **presenti** anch'essi costitutivamente **nella cellula sana** e codificano per proteine che **controllano negativamente i segnali proliferativi**.

Quindi perchè si abbia una trasformazione neoplastica in questo caso ci deve essere la **perdita della funzione delle proteine** codificate dagli oncosopressori. (*Parliamo di geni ma bisogna pensare alle proteine*).

Può essere che questo gene non sia mutato e che esprima la proteina normale ma che poi questa proteina sia inattivata da una serie di altri meccanismi.

Quindi sia l'**assenza** sia l'**inattivazione funzionale** causano una perdita della funzione della proteina e portano ad un'alterato controllo dei segnali positivi per la proliferazione o dell'azione degli oncogeni.

(Diapositiva 9)

Gli oncogeni e gli oncosopressori hanno un comportamento particolare: nel caso degli **oncogeni** è necessaria l'**alterazione di un allele (gain of function)** per far acquisire l'**attività oncogenica** alla proteina codificata dal quel gene quindi **si comportano in maniera dominante**.

Nel caso degli **oncosopressori** per promuovere l'oncogenesi **alterati entrambi gli alleli** con mutazioni che causano perditá di funzione (**loss of function**). Si comportano come dei **geni recessivi**.(*Non sono dei geni dominanti o recessivi, ma si comportano come tali!*).

Questa è la differenza fondamentale tra i due tipi di geni.

(Diapositiva 10)

Col tempo sono stati individuati altri geni che però ricadono sempre tra gli oncogeni e gli oncosopressori.

Geni che inibiscono la **morte** cellulare programmata.

Una delle caratteristiche chiave delle cellule neoplastiche che spiega **l'aumento della massa** tumorale nel tempo è proprio la proprietà che la cellula acquisisce di non andare incontro ad apoptosi che causa un **aumento della sopravvivenza** della cellula tumorale.

Infatti i tumori crescono sia perchè c'è una aumento incontrollato della proliferazione ma soprattutto perchè le cellule tumorali non muoiono in quanto i geni che controllano l'apoptosi molto spesso sono colpiti da alterazioni genetiche per cui non funzionano e in questo caso si comportano come oncogeni.

Geni che controllano i meccanismi di **riparazione** del DNA

Il DNA subisce continuamente mutazioni che però vengono subito riparate. Se però c'è una mutazione di questi geni che quindi non sono in grado di andare a riparare una mutazione avvenuta su un proto-oncogene questa mutazione viene passata alle cellule figlie e in questo caso questi geni si comportano come oncosopressori.

Geni che favoriscono **l'immortalizzazione** della cellula tumorale ovvero la capacità di proliferare all'infinito. Importanza della telomerasi e di altri geni che controllano il numero di replicazioni che una cellula può sopportare.

Geni che favoriscono la **neoangiogenesi:** importanti per la crescita tumorale.

Geni che favoriscono l'**invasività** e la **metastasi**: proprietà delle cellule tumorali maligne.

L'acquisizione della malignità avviene nel corso del tempo a causa del continuo **accumularsi di lesioni genetiche** responsabili della maggiore malignità e quindi si ritiene che esistano dei gene che controllano la capacità di una cellula tumorale di essere invasiva e altri geni responsabili della metastasi (capacità di una cellula tumorale maligna di dare origine ad tumore secondario in un'altra sede).

Hallmarks di tumori

(Diapositiva 11) (*l'ha messa anche alla prima lezione*)

Queste 6 categorie di geni sono state elencate da Windberg e collaboratori come **Hallmarks di tumori**.

Perchè si sviluppi un tumore devono essere presenti alterazioni di queste sei categorie di geni:

-Oncogeni

-Oncosopressori

-Che determinano resistenza alla morte cellulare

-Che favoriscono l'angiogenesi

-Che favoriscono l'immortalità

-Che favoriscono la metastasi

(*Diapositiva 12)*

Non basta che un solo tipo di geni sia alterato per alterare la cellula ma, a seconda del tipo di tumore, devono avvenire una **serie di alterazioni genetiche che riguardano tutte, o quasi, le categorie di geni**.

Affinchè il tumore si sviluppi devono accumularsi mutazioni a queste sei specie di geni.

(Diapositiva 13)

Studi iniziali hanno fatto capire che esistono una serie di **patologie a base infiammatoria**, anche patologie infettive, che possono **predisporre alla formazione di un tumore**.

Molto nota è per esempio la predisposizioni di un paziente con epatite B cronica allo sviluppo di un tumore maligno del fegato.

Il rapporto tra infiammazione e tumore è un argomento molto studiato.

(Diapositiva 15)

E' importante **l'interazione tra cellule tumorali e l'ambiente** in cui si sviluppano chiamato **stroma = impianto del tessuto entro il quale il tumore si sviluppa** (inizialmente considerato inerte nei confronti della progressione dei tumori).

Oggi si da un'importanza fondamentale alle cellule del connettivo e le cellule che infiltrano questo tessuto ovvero macrofagi ed altre cellule del sistema immunitario.

I **TAM (tumor associated macrophages)** infiltrano il tessuto e sono influenzati da citochine, fattori di crescita e prodotti delle cellule tumorali stesse che cambiano la faccia e la funzione di questi macrofagi e li stimolano a produrre a loro volta fattori di crescita che favoriscono la proliferazione del tumore oppure la neoangiogenesi (formazione nuovi vasi che porteranno sostanze nutritizie al tumore inducendone un'ulteriore crescita).

(Diapostiva 16)

Quindi i ricercatori hanno proposto di inserire un nuovo hallmark per i tumori ovvero l'ambiente (il **microambiente infiammatorio**).

(Diapositiva 18)

NFkB è un fattore di trascrizione importante per la trascrizione di geni proinfiammatori e può essere un bersaglio per il blocco della crescita tumorale perchè può controllare una serie di geni che sono fondamentali per la progressione della massa neoplastica. Quindi ha un ruolo pro tumorale contro il quale si può instaurare una terapia.

(Diapositiva 20)

Nel 2011 sono stati aggiunti nuovi Hallmark tra cui anche il ruolo promuovente dell'infiammazione.

Saper riconoscere questi hallmark ci permette di cercare di inibire dal punto di vista terapeutico il tumore.

(Diapositiva 22)

Sulla base di questo possiamo costruire uno schema che aiuta a spiegare il processo della trasformazione.

Abbiamo una **cellula normale** che può subire una serie di **insulti** da parte degli **agenti cancerogeni** (**chimici**, **fisici**, come le radiazioni, e **biologici**, come i virus) che possono **modificare il DNA** e quindi colpire i geni bersaglio come proto-oncogeni o oncosopressori.

Se i sistemi di riparazione sono efficienti però riparano immediatamente queste mutazioni a carico del DNA e tutto torna normale.

Se c'è un insuccesso nella riparazione, a causa di mutazioni ereditarie per esempio, allora questa alterazione genetica persiste e può determinare una serie di effetti.

Per esempio l'alterazione di un proto-oncogene che determina la trasformazione a oncogene attiva la proteina codificata da questo gene che induce una proliferazione incontrollata.

Oppure mutazioni di geni che regolano l'apoptosi per cui si ha una progressiva diminuzione di apoptosi o di altri geni che eludono la risposta immunitaria.

Se queste **alterazioni si accumulano** e interessano varie categorie di geni abbiamo una rapida **espansione clonale** della cellula alterata che inizia a progredire ovvero dirigersi verso la **formazione di una massa neoplastica** e progredendo accumula nuove mutazioni genetiche nel tempo (**progressione**). Esistono alterazioni genetiche primarie e secondarie. Questo processo va avanti fino a quando la cellula tumorale acquisisce le proprietà dell'**invasività** e della capacità di dare **metastasi** che sono le caratteristiche patognomiche delle cellule tumorali maligne.

Un’importante differenza tra tumori benigni e maligni è proprio la capacità da parte dei tumori maligni di dare metastasi.

(Diapositiva 23)

Quindi alla fine l'azione di queste categorie di geni è racchiuso in questo semplice schemino.

Geni che controllano la differenziazione, l'invasività, proliferazione ecc. sono implicati nella via verso la trasformazione della cellula in cellula tumorale maligna.

(Diapositiva 24)

ONCOGENI

Sono **geni che codificano per proteine che regolano positivamente la proliferazione**, quindi che attivano il ciclo cellulare.

Proteine che sono collocate nella cascata di trasduzione che alla fine attiva il ciclo cellulare sono quelle proteine espresse dai proto-oncogeni che se sono mutati si trasformano in oncogeni.

(*Ripassare il ciclo cellulare e tutte le proteine che intervengono in esso*: cicline, CdK ecc)

Anche le proteine del ciclo cellulare possono acquisire proprietà oncogeniche se il gene che le esprime risulta mutato.

(Diapositiva 26)

Classica domanda d'esame: <u>Quali sono i meccanismi molecolari che possono convertire un proto-oncogene in oncogene?</u>

Sono elencate in questa diapositiva ma in realtà sono più di 4.

Possono interessare o la regione codificante o la regolazione della sua espressione convertendo un proto-oncogene in oncogene.

a)La perdita di una parte del gene o la delezione possono determinare un'attivazione funzionale della proteina espressa.

Perchè se ho una delezione sul gene la sua proteina viene attivata e non disattivata? Perchè la delezione sul gene può avvenire in una zona di regolazione negativa dell'espressione della proteina.

b)Singola mutazione o piccoli cambiamenti che interessano poche basi (la funzione della proteina cambia). Quando fu scoperto questo ci fu un cambiamento epocale dei concetti.

c)Aumento incontrollato della trascrizione del gene: abbiamo una proteina normale (non modificata) che però viene continuamente tradotta quindi c'è un aumento quantitativo incontrollato.

d)Mancato o ridotto intervento di un microRNA che possono avere azione oncogenica o oncosopressorica.

Queste alterazioni portano quindi ad 1 (un **cambiamento qualitativo** della proteina) o 2 (un **cambiamento quantitativo** della proteina che però è strutturalmente normale).

(*Il professore sulla slide ha abbinato causa ed effetto con un colore*)

(Diapositiva 27)

Qua ci sono alcuni esempi di alterazioni.

A) Dalla forma normale si passa alla forma deleta in cui è stata persa appunto una parte (per esempio il classico dominio (*non ho capito il nome, Ndr*).

Le proteine senza questo dominio funzionano in maniera incontrollata e continua, continuando a dare segnali.

B) Una mutazione in una regione che cambia l'amminoacido essenziale per la funzione o per l'attività enzimatica fa si che questa proteina rimanga attiva.

C) Effetto Dose: Si ha o un attività abnorme della regione del promotore e degli enhancer percui l'RNA viene trascritto in maniera incontrollata creando più copie (maggiore quantità di proteina) oppure l'amplificazione di un gene ovvero l'aumento del numero di copie di quel gene(abbiamo visto nelle cellule tumorali un alterazione del numero di cromosomi).

(Diapositiva 28)

I meccanismi di amplificazione possono essere dovuti alle **polisomie**(aumento del numero dei singoli cromosomi come per esempio le trisomie ecc.) oppure allo sviluppo di piccoli cromosomi addizionali metacentrici(nelle cellule neoplastiche) chiamati **"Double minutes"** che contengono un numero elevato di copie dello stesso gene.

Un altro meccanismo di amplificazione è quello legato alle **HRS** (homogeneously staining regions) che sono delle regioni cromosomiche che si riconoscono facilmente per il fatto che si colorano in maniera omogenea e che riflettono la presenza di centinaia di copie di questo gene, che nel caso di questa slide è Myc, sullo stesso cromosoma.

(Diapositiva 29)

Queste alterazioni cromosomiche oggi si possono facilmente identificare tramite la tecnica **FISH (*Fluorescent in situ hybridization*)** che utilizza coloranti fluorescenti.

a) regioni HSR che si colorano facilmente

b) Cromosomi Double minutes

(Diapositiva 30)

Qui vedete un altro esempio: usando questa tecnica è molto più facile identificarle.

(Diapositiva 31)

Su questa tabella vediamo una serie di tumori umani che riguardano diversi tessuti.

Queste alterazioni sono presenti in percentuali diverse in diversi tipi di tumore.

Molto frequenti sono le regioni cromosomiche amplificate per cui si sono studiate e si è vesto che in queste regioni ci sono proprio geni che codificano per proteine oncogeniche.

(C*'è la lista dei vari geni, il professore ne ha letti alcuni senza approfondire*).

(Diapositiva 32)

Oltre a quelli già descritti troviamo altri meccanismi di trasformazione da proto-oncogeni ad oncogeni che sono:

-**Mutazioni puntiformi e delezioni** nelle sequenze regolatorie (promotore, enhancer ecc..) che favoriscono un aumento incontrollato della trascrizione.

-Nelle **traslocazioni cromosomiche** per esempio, le regioni codificanti dei geni che vengono interrotti si vanno a giustapporre una vicino all'altra e si creano delle proteine chimeriche che normalmente non esistono.

Se queste proteine sono espresse da proto-oncogeni possono essere mutate ed avere per esempio attività chinasica incontrollata.

-Mutagenesi operata da agenti biologici come i virus, tra cui un meccanismo chiamato **mutagenesi inserzionale.** Questo meccanismo è condiviso sia dai virus ad RNA sia da quelli a DNA; i due tipi di virus invece differiscono per molti altri meccanismi biologici.

Quando un virus si inserisce nelle vicinanze di un proto-oncogene(per esempio a livello del promotore o anche all'interno di un enhancer) le sequenze regolatorie del virus, che sono molto potenti, prendono il controllo del gene a valle e si può generare un aumento della trascrizione e di conseguenza della quantità di proteina.

Si può creare anche una proteina mutata se il virus si inserisce tra gli esoni.

(Diapositiva 33)

Tabella riassuntiva dei meccanismi di attivazione degli oncogeni in numerose neoplasie umane.

(meccanismo dell’amplificazione, mutagenesi inserzionale,..)

(*Sostanzialmente il prof legge la tabella senza aggiungere molto*)

c-onc è l'oncogene cellulare al contrario di **v-onc** che è l'oncogene virale che vedremo in seguito.

(Diapositiva 34)

Questa ve la vedrete con calma e mostra la biogenesi dei microRNA che hanno una formazione a livello molecolare che conosciamo bene.

Sono costituiti da poche basi (18/20 pb) ed hanno la capacità di inibire l'espressione di un gene bersaglio in quanto vanno a legarsi alle regioni 3'-5' dell'mRNA trascritto da questo gene e possono o bloccare la traduzione e di conseguenza la formazione della proteina oppure possono impedire a priori la traduzione inducendo la degradazione dell'mRNA.

Il meccanismo finale è la **mancata espressione della proteina** controllata da un particolare microRNA.

(Diapositiva 35)

I microRNA possono quindi comportarsi come oncogeni o antioncogeni. Possiamo avere infatti un microRNA che agisce come soppressore perchè si lega all'mRNA prodotto da un proto-oncogene e lo inibisce; se quindi questo microRNA non viene prodotto la proteina che deriva dall'espressione del proto-oncogene non viene degradata e può funzionare in maniera incontrollata.

Può funzionare da oncogene quando invece va a degradare la proteina prodotta da un gene oncosoppressore.

(*il professore fa un po' di confusione e finisce per leggere la slide*).

(Diapositiva 36)

Questo che ho detto è mostrato meglio qui.

La proteina oncosopressoria se c'è un difetto al microRNA che la controlla non viene più tradotta.

Oppure un microRNA con capacità antioncogenica(sopprime i prodotti di un oncogene) se viene mutato non è più in grado di compiere la sua azione e i prodotti dell'oncogene aumentano incontrollatamente.

Oggi sappiamo che l'espressione dei microRNA è controllata dagli stessi meccanismi che controllano i geni normali quindi possiamo avere delle alterazioni che interessano anche l'espressione di questi RNA tramite delezioni, mutazioni ma anche a livello post-trascrizionale.

(Diapositiva38)

I microRNA sono abbastanza studiati.

Questa tabella aggiornata elenca alcuni microRNA chiave che è stato dimostrato avere un ruolo nei tumori umani sia con azione **oncogenica** che **oncosopressoria.**

Sono stati identificati circa 800 microRNA.

(*legge un po' la slide*)

(Diapositiva 40)

Oggi ci sono dei mezzi abbastanza facili da esplorare in cui vari tipi di tumori vengono studiati dal punto di vesta dell'espressione dei microRNA durante la loro progressione. Ci sono anche delle forme terapeutiche (che vanno a coadiuvare una terapia primaria) che possono o inibire l'azione di microRNA alterati tramite piccoli antagonisti oppure inserire il microRNA mancante.

(Diapositiva 41)

Ora parliamo in maniera un po' più specifica dei vari tipi di oncogeni.

Esistono vari tipi di classificazione degli oncogeni ma noi seguiamo quella che dipende <u>dalla localizzazione della proteina espressa da un determinato oncogene nell'ambito della trasmissione e trasduzione del segnale.</u>

CLASSI DI ONCOGENI

I) Molecole segnale (es fattori di crescita)

II) Recettori di molecole segnale o intracellulari

III) trasduttori intracellulari(proteine implicate nella via di trasduzione attivata da questi recettori e che porta alla trascrizione)

IV) fattori di trascrizione

V) proteine apoptotiche(possono diventare oncogeniche)

VI) proteine che controllano il ciclo cellulare(cicline e chinasi ciclina-dipendenti)

(Diapositiva 42)

I) <u>Proteine con azione di fattori di crescita</u>

Questa tabella elenca alcune famiglie di fattori di crescita e le principali attività biologiche e per ogni tipo cellulare esistono uno o più fattori di crescita.

Per esempio la <u>famiglia dell'epidermal growth factor</u> che influenza cellule epiteliali di vari organi.(*elenca i vari fattori senza aggiungere dettagli*)

(*..poi legge la slide.*)

(Diapositiva 43)

Cosa può avvenire all'interno della cellula:

-attivazione di un oncogene che codifica per un fattore di crescita. L'oncogene si attiva e quindi si ha produzione eccessivamente alta di un fattore di crescita che viene quindi prodotto continuamente e che va a legarsi al suo recettore che può essere espresso anche dalla cellula stessa. Quindi questa cellula si autostimola continuamente senza freni. (Segnale autocrino continuo).

(Diapositiva 44)

Esempi di tumori umani che si creano il loro fattore di crescita.

Una certa quantità di mielomi si produce l'IL-6 e per bloccarla si può bloccare il recettore attraverso i meccanismi terapeutici che sono in grado di andare a colpire solo la cellula tumorale.

(..*poi legge la slide senza aggiungere altri dettagli*)

(Diapositiva 45)

II) recettori di membrana per fattori di crescita

Questi recettori sono accomunati dal dominio intracellulare che ha attività tirosin-chinasica che attiva la cascata di trasduzione.

(Diapositiva 46/47)

(*legge qualcosa ma sostanzialmente salta la slide*)

(Diapositiva 48)

Ci sono anche recettori che non hanno dominio intracellulare tirosin-chinasico e quindi innescano altri segnali di trasduzione.(per esempio TGF-b attiva serin-treonin-chinasi).

(Diapositiva 49)

Modificazioni che possono colpire l'oncogene che codifica per quel recettore.

-Per esempio può avvenire un amplificazione dell'oncogene e ne risulta che la cellula esprime un aumentata quantità di recettore sulla superficie che permetterà di poter rispondere a quantità minime del ligando extracellulare(picomolari e addirittura femtomolari).

(*Diapositiva 50*)

-Un altro meccanismo riguarda il fatto che un aumentata presenza di recettore sulla cellula può far si che i recettori formino dei cluster che praticamente alterano la funzionalità ovvero fanno in modo che i recettori attivino delle vie di trasduzione del segnale che non sarebbero attivate se il recettore fosse nella sua forma classica.

(Diapositiva 51)

-Esistono altri meccanismi. Per esempio recettori che dimerizzano e si attivano(dando inizio alla cascata di trasduzione) solamente quando il ligando si lega ad essi se sono mutati possono dimerizzare e quindi attivarsi anche in assenza del ligando (capacità di funzionare indipendentemente dalla presenza del ligando)

Una mutazione può essere l'assenza del dominio che lega il ligando che è un dominio inibitorio per cui se manca si ha un'attivazione continua e incontrollata del recettore.

(*Diapositiva 53*)

Esempi di questo tipo sono per esempio il **recettore Her2** presente nei tumori. E' un recettore che subisce una mutazione valina-glutammina a livello della porzione transmembrana per cui rimane attivo indipendentemente dalla presenza del ligando.

(*Diapositiva 52*)

Un altro esempio è **il recettore EGF** codificato da un oncogene che si chiama ERB1.

Nella forma oncogenica del recettore il dominio extracellulare viene perso e quindi rimane costantemente attivo e trasduce costitutivamente tramite il dominio tirosin-chinasico.

Sono state create diverse terapie che sono in grado di andare a colpire i recettori mutati.

(*Diapositiva 55*)

Un altro esempio di recettore mutato, che deriva da una traslocazione cromosomica che determina la formazione di una proteina chimerica, è il recettore Trk.

E' un recettore di fattori di crescita per il sistema nervoso che in seguito a una traslocazione cromosomica del gene che codifica per esso vicino al gene per la tropomiosina risulta fuso con la tropomiosina appunto.

La proteina chimerica è composta solo da un pezzo del recettore Trk che perde il dominio extracellulare ed è costitutivamente attiva.

(*Diapositiva 57*)

Vediamo vari tipi di tumori umani (*legge i vari tipi dalla slide*) messi in rapporto con il tipo di mutazione che colpisce l'oncogene che si trova mutato in essi.

Lezione di Patologia generale e fisiopatologia clinica (sem2) del 16/4/2013 (1)

Diroma Francesco

Patologia generale e fisiopatologia clinica

Professor Dusi

16/04/13

Vetrini che ci saranno all’esame

Infarto del miocardio con necrosi coagulativa

In questo vetrino è rappresentato **un muscolo** striato, **cardiaco** in particolare. Da una parte (*sulla destra, NdR*) c'è un muscolo normale.

C'è un'interruzione, una linea di demarcazione molto netta, tanto che durante la fissazione del vetrino le due parti del preparato si sono addirittura staccate. Questo distacco è artificiale ed è dovuto al fatto che l'altra parte (*quella di sinistra, Ndr)* è molto alterata, sono scomparse tutte le strutture e al loro posto ci sono degli stravasi emorragici che impediscono il riconoscimento della struttura muscolare perché le cellule sono morte: si tratta di una **necrosi cellulare**.

La necrosi coagulativa che è quella che si trova nell'infarto del miocardio, si presenta come una massa compatta, amorfa, senza più distinzione di cellule e si trova in un'area molto netta, perché molto netta è l'area che è servita dall'arteria che è stata occlusa in questo caso. Infatti, l'infarto è diretta conseguenza dell'occlusione di un'arteria. Quindi, il tessuto che è servito da quell'arteria ha un'area ben definita, mentre l'area dove c'è muscolo normale era irrorata da un'arteria adiacente. L'infarto, in questo caso è di tipo emorragico, poiché si vede una massa di globuli rossi.

I puntini viola sono **polimorfonucleati neutrofili**, quindi questo soggetto dopo aver avuto l'infarto ha avuto una reazione infiammatoria intorno alla zona danneggiata. Infatti, le cellule dell'infiammazione (i polimorfonucleati) intervengono sempre dove c'è un danno. Ricordiamo che la flogosi è una risposta al danno, quindi anche un danno non infiammatorio come quello infartuale induce una risposta infiammatoria. Questo avrebbe dovuto portare alla fagocitosi di quest'area (che però in questo caso perché è troppo grossa, infatti il soggetto è deceduto dopo poco) e attivare i fibroblasti per sostituire tutto con una cicatrice. Ci sono delle persone che vivono con una cicatrice sul cuore perché hanno superato un infarto e la flogosi ha portato poi alla riparazione tissutale.

Infarto renale

Questo vetrino, rappresenta un infarto, ma in questo caso **un infarto renale** in cui il tessuto è tutto patologico. C'è sempre necrosi. C'è sempre un'infiltrazione di **polimorfonucleat**i che, in base all'entità dell'infiltrazione stessa, permette di capire quanto a lungo il soggetto è sopravvissuto prima di morire. Infatti, nel caso della morte improvvisa non c'è una reazione flogistica. Nell'infarto renale c'è una risposta infiammatoria tutto intorno al sito di danno.

Si vede un vaso sanguigno dilatato e si riconoscono delle strutture che ricordano un glomerulo. Pur essendo diventate omogenee e avendo un aspetto cereo, perché sono necrotizzate, ricordano quelli che sono i tubuli escretori del rene. In alcuni angoli si può vedere ancora del tessuto renale sano. A maggior ingrandimento è possibile osservare un glomerulo con il suo fiocco di vasi ancora conservato.

Nella zona infartuata si possono vedere invece **glomeruli emorragici**, i vasi si sono sfasciati e tutti i globuli rossi hanno invaso e riempito il glomerulo. Si può inoltre vedere che anche i dotti escretori sono necrotici e questo ci fa capire che c'è stato un infarto.

In altre aree adiacenti ci sono **glomeruli necrotizzati**, in questo caso si tratta però di una necrosi senza emorragia.

Si parla di **infarto rosso** quando la necrosi è accompagnata da emorragia, perché lo sfacelo dei vasi porta alla fuoriuscita dei globuli rossi.

Ci sono anche zone, dove vi è una **necrosi coagulativa** che si presenta come un tessuto compatto, il nucleo delle cellule è sparito durante le necrosi, le cellule hanno digerito il loro contenuto, ma c'è però ancora una parvenza della struttura del glomerulo.

C'è anche un glomerulo che si è totalmente liquefatto e si è praticamente trasformato in una goccia di liquido: questo è un tipico esempio di **necrosi colliquativa**. Ricordiamo che la necrosi colliquativa si differenzia dalla coagulativa perché si rompono anche le membrane plasmatiche delle cellule e quindi tutto il tessuto diventa liquido, si scioglie. Importante tenere presente che nell'ictus, nell' infarto cerebrale la necrosi è di questo tipo. La scelta verso questa necrosi dipende dalla presenza di enzimi che digeriscono il tessuto.

-

Domanda: La necrosi senza emorragia è un tipo di quella coagulativa?

Risposta: No, con o senza emorragia sono degli aspetti, per esempio l'infarto può essere infarto bianco o infarto rosso**. Infarto rosso** vuol dire che le cellule sono morte e a questo si è accompagnata una notevole emorragia e quindi è caratteristico questo aspetto di stravaso emorragico. Invece **nell'infarto bianco** vedi un tessuto tutto compatto, ma però senza globuli rossi. Si tratta solo una differenza di anatomia patologica, che non comporta diverse gravità di situazione.

Tubercolosi polmonare

Questo vetrino rappresenta **un polmone**. Nella maggior parte del tessuto sono presenti gli alveoli, ma in una certa area non ci sono più e sono stati sostituiti da tessuto compatto che è una **necrosi coagulativa**. Potrebbe essere un infarto del polmone che è però è una situazione molto rara, visto che il polmone è servito da due ordini di vasi, infatti in questo caso non lo è. Intorno alla necrosi c'è un alone di cellule molto grandi, che si vedono già a piccolo ingrandimento, queste sono **cellule giganti** e si vede anche un tubercolo, che è **un granuloma della tubercolosi**. A dimostrazione del fatto che c'è un batterio che non cede all'attacco dei polimorfo nucleati, intorno c'è una corona di cellule mononucleate con monociti e macrofagi.

Nella zona adiacente del polmone si vede un bronco con l'epitelio bronchiale e la cartilagine polmonare: è da notare che si dovrebbero vedere tutti alveoli, mentre invece si vede un tessuto che normalmente non esiste nel polmone caratterizzato al centro da cellule giganti con i **nuclei a ferro di cavallo disposti in periferia della cellula**, che si chiamano **cellule di Langhans e sono tipiche (patognomoniche) della tubercolosi,** infatti una volta la diagnosi di tubercolosi si faceva su questa base. Mentre nei granulomi da corpo estraneo i nuclei sono tutti quanti al centro. (Non si conosce la ragione di questa differente disposizione dei nuclei).

Questo è un buon esempio di **istoflogosi** (flogosi cronica) che indica una flogosi che forma un tessuto nuovo che è un tessuto flogistico, formato dalle cellule azzurro violette che sono cellule

infiammatorie che vanno a sostituire il parenchima polmonare e quindi vanno ad impoverire la funzionalità del polmone.

Le cellule giganti derivano dalla fusione di più monociti.

A maggiore ingrandimento si possono contare i nuclei (a ferro di cavallo) presenti nelle **cellule giganti**: il numero dei nuclei corrisponde al numero di monociti o macrofagi da cui queste sono derivate (11 nuclei=fusione di 11 monociti). E' quindi un sincizio che dovrebbe eliminare il micobatterio, ma invece al loro interno il micobatterio si replica tranquillamente.

Si vedono delle cellule che formano un reticolato rosa bucato, queste sono **cellule epitelioidi** che costituiscono un'ulteriore evoluzione del monocita macrofago (può diventare cellula gigante oppure cellula epitelioide). Le cellule epitelioidi sono riconoscibili perché sono cellule allungate, riunite tra loro a palizzata e con un nucleo ovale allungato.

Si vedono sia dei granulomi isolati sia dei granulomi fusi insieme per formare un unico sito flogistico. Le malattie granulomatose iniziano con dei granulomi isolati, poi si moltiplicano, aumentano di volume, si fondono insieme e la risposta infiammatoria distrugge tutto il tessuto che poi porta ad un esito di **fibrosi polmonare**, infatti il polmone arriva **alla tisi,** che sarebbe la fibrosi del polmone tubercolotico, ecco perché bisogna intervenire con farmaci come isoniazide, rifampicina, etanbutolo (triade tipica di antibiotici per fermare la tubercolosi).

Tubercolosi renale

Vetrino 1: Questo vetrino rappresenta una **tubercolosi renale** (non bisogna infatti pensare che la tubercolosi sia esclusiva del polmone). E' molto difficile riconoscere il tessuto originario. Si possono vedere in rosa i residui necrotici di quelli che erano i glomeruli e tutto il tessuto è infiltrato: si può capire quindi come una flogosi possa sfigurare completamente un tessuto. Ci sono stravasi emorragici, ma in alcuni punti si riconoscono dotti escretori e glomeruli ancora riconoscibili. Tuttavia la maggior parte del tessuto è distrutta.

Vetrino 2: Rappresenta la **variante caseosa** della **una necrosi coagulativa** che però non lo si può vedere al vetrino, perché caseosa vuol dire che assomiglia al formaggio fuso e questo si può vedere solo se hai un reperto a fresco. Osservando il vetrino non si può dire se è caseosa o meno.

Vediamo però che al centro del granuloma è presente il sito dove ci sono i batteri.

Si possono vedere, più a lato**, le cellule epitelioidi,** cellule chiare che formano una palizzata fisica che imprigiona all'interno di questa struttura il micobatterio. La strategia dell'organismo è di catturare il microrganismo se non si riesce ad ucciderlo, prima con fasci di cellule e poi con fasci di connettivo, la così detta fibrosi (cosa che però risulta dannosa per la funzione dell'organo).

Verso l'esterno c'è la fascia di monociti e linfociti che arrivano dal sangue, che poi si trasformano in cellule giganti e cellule epitelioidi, solo i monociti ovviamente. I linfociti vi giungono perché è un granuloma immunologico, cioè viene attivata l' immunità se ci sono batteri. Mentre se il corpo estraneo è per esempio un pezzo di vetro, l'immunità non può essere attivata perché non è antigenico.

Domanda: Come faccio a capire che si tratta di granuloma?

Risposta: In quest'ultimo vetrino è difficile capirlo perché qui non vedi granulomi separati come nella tubercolosi del polmone, ma vedi un tessuto infiammatorio derivato dalla fusione di più granulomi. **Il trucco è quello di concentrarsi sulle necrosi e vedere cosa c'è all'immediata periferia della necrosi.**

Se fuori dalla necrosi c'è poco o niente infiammazione è probabilmente un infarto, invece se all'esterno della necrosi sono presenti cellule epitelioidi e cellule giganti allora è un granuloma.

-

Vaso sanguigno con aterosclerosi (non è un vetrino dell'esame)

Questo vetrino rappresenta un vaso sanguigno tagliato. All'interno del lume c'è una massa che sporge ed è **una placca di aterosclerosi**. E' un tessuto amorfo, perché si tratta di trigliceridi che protrudono all'interno del lume. Questa placca è ricoperta da un fascio fibroso. Se questa superficie si rompe o si fessura questo grasso esce e va a formare un embolo di grasso che occluderà immediatamente e a distanza la prima arteria stretta che trova e causerà un infarto.

Aterosclerosi dell'aorta

Si può vedere la tonaca avventizia con i vasa vasorum. Si può vedere la tonaca media con la muscolatura liscia. Si può vedere uno stravaso emorragico con il vaso che si interrompe, infatti questo soggetto è deceduto per aneurisma dissecante dell'aorta, che vuol dire che a un certo punto si è rotto il vaso e il sangue è entrato nella parete ed ha dissecato i vari strati. La cosa che è importante notare è che sopra la tonaca media dovrebbe esserci solo un leggero film di endoteliociti e invece si vedono una serie di materiali che normalmente non ci sono in un vaso sanguigno né nell'aorta, né in nessun'altra arteria. Questa infatti è **una grandissima placca di aterosclerosi** superimposta all' endotelio, è amorfa perché è formata da acidi grassi che non si colorano e si possono vedere dei fasci di connettivo che formano una capsula che tiene chiuso tutto questo materiale. Se questi fasci si rompono esce il materiale lipidico e avremo embolia e infarto.

Ingrandimento maggiore su cappa fibrosa:

Si possono vedere delle zone bianche a forma di fuso, che sono gli stampi dove prima c'erano i **cristalli di colesterolo**, che si sono sciolti con la fissazione del vetrino. Quindi in questa placca c'erano grossi cristalli di colesterolo. Infatti l'aterosclerosi è dovuta ad infiltrazione di LDL sotto l'intima e poi ossidazione, reclutamento dei macrofagi, flogosi, eccetera.

Le cellule violette sono **monociti e macrofagi** che formano le **phone cells** che sono le cellule dell'infiltrato infiammatorio attivato. Le strisce viola non sono da considerare perché sono artefatti (è precipitato del colorante sul vetrino).

Domanda: Sopra la placca c'è solo connettivo o anche endotelio?

Risposta: Sopra ci potrebbe essere un filo di endotelio, ma è più facile trovare una cappa di piastrine, perché visto che l'endotelio è molto danneggiato, di solito come aggravante sopra a queste cappe fibrose si appiccicano le piastrine. Successivamente si attivano le piastrine che eventualmente attivano un po' di fibrina che forma un coagulo sopra.

Quindi ci sono diversi **problemi nell' aterosclerosi**:

-primo che la placca protrude il vaso e ne occlude il lume è quindi il sangue non scorre;

-secondo che sopra la placca si può formare un aggregato di coagulazione e piastrine;

-terzo che sia la placca che il aggregato possono staccarsi e formare gli emboli.

Questo spiega perché l'aterosclerosi porta essenzialmente all'infarto.

Polmonite

Questo vetrino assomiglia molto a un fegato, ma non lo è. Questo è **un polmone** con una polmonite in fase di epatizzazione. Sembra un fegato perché gli alveoli invece di essere bianchi, sono pieni di liquido infiammatorio, con cellule infiammatorie. Questa è **una polmonite** le cui caratteristiche sono quelle della flogosi con fuoriuscita di liquido e cellule: **l'alveolite sierosa.** In questa situazione esce fuori questo liquido, escono fuori le cellule e si raccolgono negli alveoli. Gli alveoli, quindi, non respirano più e auscultando il torace dal paziente si sente il rumore delle bolle. Questo rumore è dovuto all'aria che entrando negli alveoli pieni di liquido forma bolle. Questo soggetto ha avuto una **polmonite lobare**, cioè un intero lobo del polmone era invaso da liquido infiammatorio. Vediamo il setto alveolare, con i globuli rossi che passano fra i capillari, e l'alveolo è pieno di cellule mononucleate (si trattava probabilmente di polmonite virale).

Si può vedere un capillare con i globuli rossi disposti l'uno sopra l'altro. Infatti, la causa dell'ingorgo vascolare è che **i globuli rossi** che normalmente passano in fila uno dietro l'altro negli strettissimi capillari polmonari, qui si sono bloccati e hanno formato questa specie di pila di monete che è abbastanza caratteristica della polmonite. Le macchie nerastre sono grumi di colorante e non sono da considerare.

In un alveolo si può vedere un reticolo molto sottile e molto delicato che è di fibrina. **L'essudato** può essere **sieroso** e allora resta liquido o coagulare e si passa a una **flogosi fibrinosa**. In questo caso c'è una flogosi fibrinosa, il sangue comincia a coagulare si formano dei tralci di fibrina e la guarigione è più complicata, perché se prima basta che il liquido sia riassorbito a livello venulare, mentre in questo caso prima devono essere demoliti i tranci di fibrina e poi viene riassorbito il liquido, quindi la guarigione è più lunga.

In questo vetrino la flogosi è acuta, mentre prima era cronica.

Amiloidosi del fegato

Questo vetrino rappresenta un fegato. E' **un'amiloidosi del fegato**. Si vede una sostanza rosa che è **amiloide**. Per vederla specificamente bisognerebbe fare una colorazione specifica con il rosso congo, che in questo caso non è stata fatta perché tutti i vetrini sono stati colorati allo stesso modo per renderli confrontabili tra loro. Si può dire che è amiloide perchè a maggiore ingrandimento si può vedere che gli epatociti non sono più organizzati in lamine, perché tra le cellule si accumula sostanza amiloide, che si mantiene sempre extracellulare e va a infiltrare e dissecare le varie cellule. E' facile distinguere dalla necrosi per la tipica caratteristica a pennellate dell'amiloide. C'è una chiara sofferenza degli epatociti, che si vede perché alcuni epatociti sono in mitosi, hanno i nuclei che si stanno dividendo, mentre normalmente il fegato è un organo a cellule stabili. Questo è dovuto al fatto che l'amiloide separa le cellule dal loro supporto trofico (dai capillari sinusoidi) e queste hanno sempre meno nutrimento ed iniziano a morire e a soffrire.

Amiloidosi della milza

Questo vetrino è sempre **amiloidosi** però **nella milza**. E' un po' difficile capire che si tratta di milza, ma si possono vedere delle zone piene di linfociti che rappresentano la polpa bianca e delle zone di polpa rossa. Si può vedere come la milza sia invasa da strutture amorfe di proteina a foglietto beta: **l'amiloide**. Si può vedere che questa amiloide è molto più concentrata attorno ai vasi sanguigni, origina da lì e poi si allarga a cerchi concentrici e questo tradisce l'origine ematica dell' amiloide.

Steatosi e cirrosi del fegato

Questo vetrino rappresenta **una cirrosi del fegato** o **una fibrosi** che è la stessa cosa. Si vedono fasci di connettivo vanno a circondare quelli che sono i lobuli epatici, ma dei lobuli epatici resta ben poco.

I puntini bianchi sono epatociti pieni di grasso, cioè la cosiddetta **steatosi del fegato**. La steatosi è una situazione dove c'è un accumulo di trigliceridi all'interno degli epatociti. Questa si potrebbe chiamare steato-cirrosi, infatti questo era il fegato di un etilista, di un forte bevitore cronico. Negli epatociti c'è così tanto grasso che il citoplasma e i nuclei sono spostati alla periferia.

Si possono vedere **fibroblasti** attivi con i nuclei allungati. Si possono anche vedere degli epatociti abbastanza sani che permettono di capire che si è nel fegato.

Steatosi del fegato

Questo vetrino è preso da un soggetto che ha **solo la steatosi del fegato**. Potrebbe essere un soggetto obeso che mangia troppi grassi.

Si possono vedere tanti puntini bianchi, epatociti pieni di grasso, con nucleo alla periferia.,.

In questo caso non ci sono i fasci di connettivo tipici della fibrosi. Gli epatociti sono molto sofferenti, questo vuol dire che la malattia metabolica è spiccata. Molte cellule sono in mitosi, stanno cercando di rigenerare disperatamente le cellule che stanno morendo per il disastro metabolico.

Nodulo mammario (non è tra i vetrini dell'esame)

Qui siamo nel settore dei tumori. Questo vetrino rappresenta il tessuto di una signora che ha avuto **un nodulo mammario**, che è stato asportato.

Nella parte superiore si vede la superficie cutanea, e sotto c'è il nodulo che è formato da fasci di cellule allungate che ricordano molto i fibroblasti. Infatti le cellule sono tutte simili e hanno tutte aspetto allungato, anche se la distribuzione è atipica, cioè non forma un tessuto particolare Quindi in questo tessuto abbiamo **un fibroma**, un tumore benigno dei fibroblasti e quindi una volta che è stato esportato il nodulo la paziente non ha avuto più problemi. Un tumore benigno si presenta con cellule abbastanza simili a quelle normali, ma con qualche atipia.

Cute normale (non è tra i vetrini dell'esame)

Questo vetrino è una **pelle normale**. Si può notare il derma con le papille dermiche, il giunto dermo-epidermico, le cellule basali della pelle, che differenziano mano a mano che vado verso la superficie. Prima sono staminali, poi diventano spinose, poi granulose, formano i granuli di cheratina e poi formano le lamelle cornee che rivestono la nostra pelle. Questo per mostrare un esempio di differenziazione cellulare visto che nei tumori c'è un blocco di questa differenziazione. Più prematuro è questo blocco, più maligno è il tumore.

Carcinoma della pelle (non è tra i vetrini dell'esame)

Questo vetrino rappresenta un soggetto con **un carcinoma**, un tumore maligno della pelle. Si può subito notare che le cellule sono diverse da quelle normali, ma soprattutto che dallo strato basale arrivano sulla superficie senza più differenziazione. Non ci sono più gli strati di prima, perché le cellule sono state bloccate in uno stadio immaturo: sono delle **cellule atipiche immature** che non sono neanche più delle vere lamelle cornee, perché hanno perso la loro funzione.

Tuttavia, nessuna delle cellule tumorali si trova nel derma sottostante e questo vuol dire che il **tumore è in situ**, cioè tutte le cellule tumorali sono esternamente alla lamina basale e quindi i tumori non possono raggiungere vasi sanguigni, linfatici e andare in giro a fare metastasi. Quindi il tumore anche se istologicamente è molto maligno può essere curabile semplicemente con l'asportazione.

Tutti i tumori all'inizio sono così, su tutte le mucose, il problema è che sulla cute questo tumore si vede perché c'è un'escrescenza cutanea, mentre negli organi interni la lesione non ha nessun sintomo e quindi i tumori vengono di solito alla nostra attenzione quando diventano dolorosi e sono già in fase avanzata, in fase di progressione, in fase di metastasi.

A maggiore ingrandimento si vedono **cellule tumorali chiaramente atipiche**, si vede la cromatina fortemente addensata e si vede che le cellule non formano più la tipica stratificazione.

Adeno-carcinoma del colon

In questo vetrino ci sono cellule caliciformi mucipare di una ghiandola normale del colon. E' presa da un soggetto che aveva ostruzione del colon con emorragie e diarrea. In una parte si vedono cellule caliciformi mucipare normali con anche del muco.

Dall'altra parte non si vedono più le cellule caliciformi mucipare, ma ci sono cellule che sono la **versione tumorale** di queste ultime, che formano degli aggregati molto strani con delle strutture chiare che ricordano il lume ghiandolare. Tuttavia questi dotti sono riprodotti male e nemmeno si aprono nel lume, ma restano inclusi nella massa tumorale. Quindi, questo **è un adeno- carcinoma del colon**, un tumore maligno del colon a partenza dalle ghiandole che tenta di riprodurre le ghiandole.

Le cellule tumorali cominciano ad intaccare i piani sottostanti: la muscolatura del colon, questo vuol dire che un tumore è maligno altrimenti non andrebbe ad infiltrare la muscolatura. Questo provoca gravi conseguenze per la peristalsi e forti dolori al paziente. Quindi l'infiltrazione dei piani sottostanti è un altro segnale di malignità.

A maggiore ingrandimento possiamo vedere i nuclei delle cellule: la cromatina è difficilmente distinguibile perché si trova tutta alla periferia del nucleo. Queste alterazioni nucleari ha fatto dire ai ricercatori che i tumori devono derivare dal nucleo perché simili alterazioni cromosomiche non si vedono in nessun'altra lesione.

Aumentando l'ingrandimento si può vedere un capillare con all'interno (non solo globuli rossi e globuli bianchi), ma un aggregato di cellule tumorali, quindi vuol dire che ci sono dei tentativi di metastasi, cioè alcune cellule maligne sono entrate nei vasi sanguigni e sono pronte per partire ed andare a distanza.

Quindi un tumore con cellule di quest'aspetto, infiltrazione dei piani sottostanti e cellule tumorali all'interno dei vasi sanguigni sarà sicuramente un tumore maligno. Il tumore era molto grosso, era una massa vegetante e protrudente all'interno del colon, che bloccava l'intestino.

Domanda: Come mai la metastasi comporta dolore?

Risposta: Comporta dolore perché il tessuto viene distrutto, viene alterata la muscolatura, vengono infiltrati i piani sottostanti e ci sono delle emorragie, come se ci fosse un qualcosa che ti trafigge, e poi il dolore più tipico è quello di alterata peristalsi. Ci possono essere, inoltre, crampi, dolori trafittivi, a seconda di dove queste cellule vanno a toccare i terminali nervosi sensitivi che ci sono. Sicuramente arrivato a questo punto ciascun tipo di tumore dà dolore. Mentre allo stadio precedente il dolore non c'è, perché le cellule sono poche centinaia in un tessuto e nessuno se ne accorge.

Tumore maligno dello stomaco

Questo vetrino rappresenta **uno stomaco**, lo si può riconoscere dalle tipiche cripte della mucosa gastrica, le ghiandole mucose a secrezione esterna, si vede anche un nodulo linfatico. Quindi questa è una tipica mucosa gastrica. Seguendo la mucosa si può vedere che ad un certo punto si interrompe e c'è come un'escavazione, un buco che è **un'ulcera** della mucosa e sul fondo c'è un tessuto compatto. In questo tessuto si può vedere che le cellule formano dei fasci cellulari, ma la cosa che salta subito all'occhio anche a basso ingrandimento è il fatto che **la muscolatura** che normalmente forma i fasci lineari, è sfigurata, ridotta a pezzi dall'infiltrazione di cellule. Siamo a piccoli ingrandimenti, ma pensiamo subito che solo **un tumore maligno** può fare una cosa del genere.

A maggiore ingrandimento si può notare la popolazione cellulare tumorale. In questa popolazione ci sono cellule grandissime, cellule medie, cellule piccole, questo significa che le cellule sono già nella fase della progressione tumorale.

La progressione tumorale è quella fase della crescita del tumore nella quale all'interno del tumore cominciano a formarsi del sub cloni, delle sottofamiglie. All'inizio tutte le cellule tumorali sono uguali alla cellula madre che le ha generate e quindi la popolazione è omogenea. In seguito a causa dell'instabilità genetica ed alterazioni del DNA cominciano ad esserci figlie l'una diversa dall'altra e abbiamo la formazione di sub cloni cioè di famigliole distinte e quindi polimorfismo delle cellule della stessa massa tumorale. Quando si fa la chemioterapia verranno colpite quindi solo le cellule chemio sensibili e quindi bisogna fare un altro ciclo, cambiare il cocktail, per cercare di eliminarle tutte. Il polimorfismo cellulare vuol dire che il tumore è molto aggressivo, è un tumore maligno ed è in fase avanzata, perché siamo già alla differenziazione sub clonale.

Spesso all'esame si chiede che cos'è la progressione tumorale: vuol dire che il tumore progredisce verso la malignità, che diventa sempre più maligno per l'accumulo di mutazioni causato dall'instabilità genetica, non vuol dire che il tumore progredisce e va avanti.

Si può vedere **la muscolatura** irriconoscibile, distrutta dalle proteasi tumorali e **i capillari** con all'interno aggregati di cellule tumorali.

Si può vedere una cellula tumorale atipica, in cui il nucleo si è diviso più volte senza disgiunzione del citoplasma (mitosi atipica), ed è nato **un policarione**, una grossa cellula con tanti nuclei ed un solo citoplasma.

Linfonodo con metastasi

Questo vetrino rappresenta **un linfonodo**. I linfonodi sono sedi di metastasi e vengono subito esaminati, tagliati a fettine quando c'è il sospetto di un tumore maligno.

All'interno ci sono delle aree un po' più scure, diverse che potrebbero essere dei centri germinativi. A maggiore ingrandimento si possono vedere de**i linfociti** che sono tutto nucleo e niente citoplasma, dei dischetti blu, facilmente identificabili tra le altre cellule bianche.

Tra queste proliferazioni linfocitarie ci sono delle cellule con aspetto più rosa che non sono cellule endemiche del linfonodo, infatti sono cellule che vengono da fuori e che sono andate a colonizzare il linfonodo, sono **delle metastasi di un tumore all'interno del linfonodo**.

Come faccio a dire che sono cellule che vengono da fuori?

Se il tumore fosse nato dal linfonodo avremmo una parte del linfonodo già invasa ed un'altra ancora da invadere, avremmo tutte le cellule omogeneamente distribuite.

In questo caso ci sono invece dei gruppetti, dei cloni qua e là, questo significa che le cellule sono entrate nei diversi punti e hanno formato le loro famiglie. Queste cellule poi crescono e quindi se si osserva il linfonodo dopo un certo tempo, non si vedono più linfociti, ma il linfonodo tutto pieno di cellule tumorali. Una volta che è finita l'invasione, queste cellule passano al linfonodo successivo e passando da stazione a stazione linfonodale vanno ad invadere un numero sempre maggiore di linfonodi: si insinuano nei linfonodi che dovrebbero essere gli organi linfatici che ci difendono dal tumore.

Liposarcoma

Questo vetrino rappresenta **un tessuto adiposo,** si possono vedere **gli adipociti**, le cellule che contengono il grasso. Qui c'è un tumore maligno a partenza dai precursori degli adipociti che si chiama **liposarcoma**, perché quelli mesenchimali sono i sarcomi, quelli epiteliali i carcinomi.

Lipocarcinoma

Il prof dice che è praticamente impossibile capire che si tratta di tessuto adiposo, infatti all'esame non ci verrà chiesto di dire perché è tessuto adiposo (ci sono dei piccolissimi particolari che permetterebbero di capirlo, ma è meglio non soffermarsi).

Il tessuto tumorale ha completamente sostituito il tessuto adiposo e si può vedere polimorfismo cellulare, cellule di varie dimensioni (polimorfismo cellulare), quindi un tumore molto aggressivo in fase avanzata.

A maggiore ingrandimento alcune cellule hanno ancora degli accumuli di grasso all'interno e hanno ancora delle stigmati di eritrociti, ma questo va oltre quello che è richiesto.

Questo è un **tumore maligno**, gravissimo, agressivissimo, rapidamente metastatizzante per via ematica. Si può vedere una divisione atipica con la creazione di cellule che non sono uguali alla madre, da cui nascono delle altre forme ancora, c'è quindi un'evoluzione di forme.

Domanda: Quali sono le sedi più comuni del liposarcoma?

Risposta: Può partire da un qualsiasi punto dove ci sia del tessuto adiposo, quindi non c'è una sede più comune. Visto che è altamente invasivo, spesso non si riesce a capire da dove sia partito. Questo paziente, aveva una colata di cellule tumorali che invadevano tutta la parte posteriore del torace e dell'addome e infiltravano anche gli spazi intorno alla colonna vertebrale con dolori radicolari spaventosi. Inoltre dal punto di vista prognostico per il paziente non è importante da dove il tumore sia partito.

Domanda: Che cos’è il lipoma?

Risposta: Il lipoma si presenta con una crescita di tessuto grasso molto compatto, sembra quasi un grumo di cellule adipose, che non dà nessun problema. Le cellule sono tutte simili tra di loro.

Ulcera peptica

Questo vetrino rappresenta **un’ulcera normale**. Questo è uno **stomaco** normale con uno scavo nella mucosa (ulcera), mentre quella di prima era un’ulcera causata da tumore. Sul fondo di quest’ulcera c’è un colore viola molto strano, che non è costituito da cellule, ma da detriti acidificati dall’ HCl gastrico, che quindi è un’**ulcera peptica** non un’**ulcera da cancro**, che può essere dovuta ad Helicobacter Pylori o da acidità gastrica, non da un tumore. La prognosi nei due casi è ben distinta.

I puntini azzurri sono un infiltrato di **cellule infiammatorie** perché l’ulcera crea necrosi e quindi la risposta infiammatoria c’è sempre, quindi qui non ci sono cellule tumorali.

Ci sono dei **pezzettini di cellule**, se ci sono delle cellule sono nere perché sono acidificate e distrutte e quindi è la visualizzazione di una necrosi e non di un tumore.

Fine della parte sui vetrini.

Particelle del sangue in 3D

In un **soggetto anemico** i globuli rossi hanno un aspetto centrale quasi trasparente perché sono poveri di emoglobina.

A tre dimensioni, si può vedere **un monocita** che mangia una particella di lattice artificiale opsonizzata (rivestita da anticorpi). Il monocita, usa i lamellopodi per allungarsi, allunga tutta la sua membrana intorno alla particella per mangiarsela, mentre si ancora sempre di più con i filopodi. Mentre sta inglobando la particella, emette un mantello citoplasmatico perché anche la superficie su cui è stato appoggiato viene vista come qualcosa di estraneo e quindi cerca di inglobarla. Possono fagocitare anche più particelle per volta ed entrare in competizione con altri monociti.

Possiamo valutare **la fagocitosi dei polimorfo nucleati** anche microscopicamente, vedendo quanti globuli rossi estranei (di montone in questo caso) hanno al loro interno, finché questi ultimi non vengono digeriti dagli enzimi proteolitici.

Infine, si può visualizzare **una piastrina**, che ha i suoi filamenti contrattili e granuli di secrezione, e che in 3D sembra un po’ una focaccia, mentre vista di fianco è molto sottile. Tuttavia, quando si attivano, i filamenti si contraggono ed emettono de tentacoli con i quali si appiccicano alla parete del vaso, si attaccano fra loro e formano il tappo piastrinico che serve per bloccare il sangue.

Lezione di Patologia generale e fisiopatologia clinica (sem2) del 17/4/2013 (1)

Prof.
Minuz
Data 17/04/2013

Sbobinatore: Mazzo Umberto

Revisore: Antonelli Stefano

INSUFFICIENZA RENALE

La funzione renale ha un ampio margine di autoregolazione. Quando sono superati i limiti della fisiologica autoregolazione si possono creare situazioni di insufficienza renale .

1. **Insufficienza renale prerenale**. Il rene è in grado di funzionare e non ha subito danni di tipo organico, ha un'anatomia funzionale conservata, ma è ipoperfuso. Quindi il deficit di funzione dipende essenzialmente dalla variabile circolazione renale.
2. **Insufficienza renale parenchimale**. C'è un danno organico del glomerulo, del tubulo oppure dell'interstizio. In questo caso c'è disturbo funzionale.
3. **Insufficienza renale postrenale**. Un ostacolo del flusso dell'urina al di fuori del rene determina una modifica dei parametri di ultrafiltrazione glomerulare. Questo è causato da una variazione della pressione tubulare.

Queste sono le tre importanti distinzioni che si fanno nell'ambito dell'insufficienza renale. L'insufficienza renale, come nel caso dell'ipertensione arteriosa, è di tipo operativo, cioè la sua progressione non è distinguibile in base a dei criteri estrinseci controllabili o classificabili. Si tratta solo di una variazione di un continuum dell'incipit di funzionalità renale. Per cui la soglia di alterazione della risposta è molto variabile e dipende delle indicazioni operative per cui l'incremento della creatinina ,qualunque sia il valore di partenza, oppure un decremento del filtrato glomerulare calcolato può essere usato come **indice dell' insufficienza renale** rispetto ai valori normali.

Oppure si possono usare dei parametri come la secrezione funzionale della creatinina e altri indicatori come ad esempio l'aumento della concentrazione di sostanze azotate, in particolare l'urea, nel plasma.

INSUFFICIENZA PRERENALE

La filtrazione glomerulare dipende essenzialmente da due elementi:

1. Apporto sanguigno
2. Struttura del glomerulo che deve essere idonea al processo di filtrazione.

I livelli di pressione e il flusso ematico dell'arteriola afferente sono fondamentali determinanti nel garantire in presenza di una normale struttura glomerulare la funzione di filtrazione.

L'entità del flusso ematico condiziona non solo la filtrazione ma anche le successive fasi di riassorbimento tubulare (questi aspetti li avevamo già visti quando avevamo visto i meccanismi di recupero dei fluidi nelle condizioni di ridotto apporto idrosalino). Se io riduco l'apporto idrico ho una riduzione del volume urinario. Se riduco l'apporto idrosalino l'escrezione urinaria di Na è ridotta e si raggiunge un nuovo equilibrio.

Questa condizione è essenzialmente mantenuta attraverso una serie di meccanismi che vedono nel sistema angiotensina-aldosterone e nella modulazione dell'attività del trasportatore di Na. Tuttavia nell'insufficienza renale non abbiamo davanti solo il problema del bilancio idrosalino, abbiamo anche il problema della funzione di eliminazione di sostanze che devono essere eliminate, perché potenzialmente tossiche per l'organismo, attraverso il rene. Quando siamo in condizioni di insufficienza renale è questo l'aspetto, oltre al bilancio idrosalino, che deve essere tenuto presente.

Il bilancio idrosalino per certi aspetti va per conto suo. Può essere mantenuto più di quanto non sia mantenuta la capacità selettiva.

La perfusione renale

Può essere modificata da moltissime variabili:

- la quantità di acqua che viene assunta, la quantità di Na che viene assunta, e di acqua che di conseguenza giunge al rene attraverso il fenomeno della diluizione isotonica nei volumi extracellulari.

- la pressione arteriosa. Se si ha una condizione di riduzione della pressione arteriosa, il flusso sulle arterie renali sarà ridotto e di conseguenza la perfusione renale sarà ridotta.

- L'attività del sistema autonomo incide, e possono incidere anche meccanismi locali per determinare il flusso intrarenale. La modulazione della portata di volume plasmatica è indipendente dalle condizioni generali del flusso anche se è strettamente correlata ad essa, per cui se io ho un'alta gettata cardiaca o una pressione sostenuta avrò sicuramente un aumento della funzionalità renale.

- Modulazione arteriola afferente. Il sangue che passa attraverso l'arteriola afferente quindi subisce un processo di filtrazione, e una parte di esso però passa attraverso il circolo che non include il glomerulo. La modulazione del tono dell'arteriola afferente è molto ampia e la capacità di autoregolazione a livello renale è molto ampia. Di regola comunque alta portata vuol dire vasodilatazione ma anche una bassa pressione di perfusione causa vasodilatazione. Questo avviene tramite una serie di meccanismi; uno dei quali è il feedback glomerulare implicato nella regolazione dell'arteriola afferente in base al livello di fluidi che giungono nel tubulo distale. Tuttavia l'ampia capacità di autoregolazione dell'arteriola efferente tende a mantenere un alto livello di perfusione glomerulare (almeno in certi distretti della corticale).

È possibile reindirizzare i flussi della totale portata renale plasmatica e molto dipende dagli eicosanoidi , quindi principalmente dal rilascio COX-dipendente di **prostaciclina**. L'evidenza che questo sistema sia fortemente implicato nella regolazione del tono dell'arteriola afferente è uno dei meccanismi che portano alla nefrotossicità degli antinfiammatori non steroidei, che sono inibitori a maggiore efficienza delle ciclossigenasi inducibili (COX2) rispetto alle COX1.

Ma vediamo anche molte delle risposte adattative vascolari e anche la funzione tubulare a livello renale, quindi molte delle autoregolazioni dell'arteriola afferente, sono condizionate dalla capacità renale di modulare i flussi e modulare il tono dell'arteriola efferente, anch'essa altamente modulabile nel suo tono e la modulazione del tono dell'arteriola efferente ha un'importante funzione nel mantenere una pressione di perfusione intraglomerulare adeguata.

C'è una sorta di dissociazione nella regolazione dell'arteriola efferente che è dovuta al fatto che l'arteriola efferente esplica una parte della sua attività nella generazione di angiotensina e nella conversione di angiotensina 1 in angiotensina 2 (che è avvenuta nel circolo prossimale e nella circolazione intrarenale). Quindi una modulazione in senso vasocostrittivo dell'arteriola efferente può determinare una maggiore pressione di perfusione a livello glomerulare indipendentemente dalla pressione dell'arteriola afferente. È una sorta di valvola che determina flussi e pressioni intraglomerulari.

A livello dell'arteriola afferente ci sono delle strutture specializzate che sono dei recettori di tensione che riconoscono la pressione di riempimento quindi lo stress di parete dell'arteriola afferente. Qui esistono delle cellule in grado di rilasciare **renina** che agisce sull'angiotensinogeno che è presente in circolo e forma angiotensina 1, che trova sulla superficie delle cellule endoteliali del circolo un enzima che si chiama angiotensin converting enzime (ACE) che la converte in angiotensina 2. Il principio attivo è rilasciato attraverso il flusso glomerulare e agisce sull'arteriola efferente.

Un secondo importante meccanismo è la quantità di soluti, il flusso di soluti e la quantità di Na che giungono a livello del tratto convoluto distale del tubulo, in una struttura che è la **macula densa** . Emettono un segnale per il quale una riduzione del flusso (e quindi una variazione verso il basso del contenuto di NaCl) determina la sintesi COX2-mediata di prostaciclina che va ad agire su due cose:

1. Tono dell'arteriola afferente
2. Rilascio di renina

Quindi la variazione di contenuto di NaCl del tubulo convoluto distale determina il **feedback tubulo-glomerulare,** un rilascio di renina prostaciclina-dipendente, quindi l'attivazione di un meccanismo che migliora per certi aspetti la perfusione glomerulare. Alti volumi e alte concentrazioni di NaCl inibiscono la sintesi di prostaciclina e si ha uno spegnimento del segnale che porta alla sintesi e al rilascio di renina. Quindi è un meccanismo di autoregolazione tubulo glomerulare molto efficiente per determinare l'autoregolazione intrarenale di flussi a livello glomerulare e di capacità di filtrazione.

Ci sono altri segnali che determinano il rilascio di renina

- L'attività adrenergica attraverso i recettori di tipo β.

- In piccola parte per attivazione dei recettori di tipo α

- La variazione di tensione dell’arteriola afferente

L’autoregolazione glomerulare è modulata da una serie di fattori come:

1. l’NO, che è sinergico con la prostaciclina nel controllare il controllo del tono vascolare
2. L’endotelina, che è funzionalmente implicata nella modulazione verso il basso del tono arteriolare del circolo renale e diventa protagonista nei meccanismi di alterata perfusione renale nei processi di danno renale
3. Eicosanoidi
4. Attività simpatica
5. Contrazione mesangiale. Le cellule del mesangio che circondano il glomerulo rispondono agli stimoli costrittori analogamente a quanto non avvenga per la muscolatura liscia vascolare, e la contrazione del mesangio è uno dei meccanismi attraverso i quali posso escludere, in condizioni di ipoperfusione, alcuni settori della corticale renale dalla perfusione e quindi anche dalla filtrazione.

Se ho una riduzione della perfusione renale non solo si ottimizza,attraverso questi meccanismi, la condizione di filtrazione glomerulare ma si ha anche una ridistribuzione dei flussi ematici verso la **corticale renale interna** a discapito della corticale più esterna e anche in parte della midollare. Questo determina una ridistribuzione dei flussi, determinata in questo caso dalla vasocostrizione secondaria e dalla contrazione mesangiale. Si ridistribuiscono i flussi verso la corticale interna, dove ci sono glomeruli di grosse dimensioni associati ad una struttura tubulare più rudimentale in termini di lunghezza e di facilità di riassorbimento. Dunque si ha una sorta di ottimizzazione del flusso in condizione di ipoperfusione verso una porzione del rene ricca di glomeruli ad alta capacità di filtrazione.

La capacità di autoregolazione in funzione della pressione arteriosa sistemica è molto ampia, però se la pressione arteriosa scende a valori molto bassi ma ancor compatibili per la perfusione di altri organi, come una pressione sistolica di 80mmHg, si determina la fuoriuscita dal range di autoregolazione. In sostanza i meccanismi descritti non sono più in grado di mantenere l’ottimizzazione dei flussi, anzi paradossalmente funzionano da moltiplicatori della risposta vaso costrittiva

Se io ho una pressione arteriosa sistemica che tenta di crescere posso dimostrare con facilità che, raggiunto un limite di 80mmHg di pressione sistolica, il rene non è in grado di autoregolare i flussi e la funzione glomerulare.

REGOLAZIONE DELLA PRESSIONE

Un altro concetto che spiega l’efficacia di questo sistema di autoregolazione è la valutazione delle pressioni dei flussi che si determinano a seconda che ottengo una vasocostrizione pre- o postglomerulare.

1. **vasocostrizione preglomerulare**. Nel passaggio del sangue attraverso il glomerulo ho una caduta di pressione fisiologica che è determinata dal flusso e dalla sezione. Per cui da 100mmHg in ingresso esce il sangue a 20 mmHg (?) con una pressione nel tratto intermedio di circa 60mmHg. Se determino una vasocostrizione a monte (come può avvenire in una intensa vasocostrizione da stimolo adrenergico legata ad una condizione di relativa iperperfusione) pur mantenendo bassi flussi come nel caso della disidratazione o nell’emorragia, pur mantenendo una pressione di 100mmHg come valore di riferimento, il passaggio del flusso attraverso il tratto di diametro minore determina un aumento delle

resistenze al flusso quindi un aumento della velocità di flusso ma una diminuzione delle pressioni dei flussi a valle con diminuzione brusca della pressione intraglomerulare. Anche ci fosse a valle una vasodilatazione o fosse mantenuto un flusso normale, si determina una caduta di pressione intraglomerulare.

2. **vasocostrizione postglomerulare**. Viceversa se ho attraverso un meccanismo come quello del rilascio di angiotensina sulla arteriola efferente, a parità di pressione di riferimento ho un guadagno di pressione intraglomerulare (questo avviene ad esempio se ho contemporaneamente una vasodilatazione da prostaciclina preglomerulare e una vasocostrizione postglomerulare). Aumenta la pressione intraglomerulare, il differenziale di pressione con l'arteriola efferente aumenta e quindi ho un recupero funzionale notevole. In questa situazione quello che è avvenuto è stato una caduta di pressione e della perfusione e questo valore di recupero porta valori di pressione pari alla normalità ma non a valori più alti. Quindi sono utilizzati questi valori normalizzati per spiegare il meccanismo. Però il meccanismo si attiva quando varia la pressione o il flusso in ingresso.

VGF = coefficiente di ultrafiltrazione x pressione di ultrafiltrazione =

= coefficiente di ultrafiltrazione x (pressione idrostatica capillare glomerulare – pressione idrostatica del tubulo) – (pressione oncotica capillare glomerulare – pressione oncotica del tubulo) =

= coefficiente di permeabilità all'acqua della parete capillare della superficie filtrante x(differenza di pressione idrostatica – differenza di pressione oncotica)

Questa formula spiega quello che accade sia in insufficienza renale prerenale sia nelle insufficienze parenchimali sia in quelle ostruttive postrenali. È molto simile a quella che spiega la funzione dei capillari in periferia, l'unica differenza sostanziale è data dal fatto che le pressioni idrostatiche, che qui sono all'interno del glomerulo, sono molto più alte di quelle presenti nella capillarizzazione periferica del microcircolo tissutale. Il differenziale di pressione idrostatica tra lume del vaso glomerulare e interstizio, in questo caso la capsula di bowman, quindi la pressione intratubulare, è molto elevato perché in condizioni fisiologiche la pressione intratubulare tende allo zero (noi abbiamo un sistema tubulare che da un calibro molto piccolo tende a calibri maggiori, per cui la resistenza al flusso di uscita dell'urina dovrebbe essere molto piccola). La pressione nel capillare glomerulare è molto elevata, di poco inferiore alla pressione con cui il sangue arriva al rene, quindi c'è un elevato differenziale di pressione idrostatica. Bisogna ovviamente considerare la pressione media del capillare glomerulare: la pressione di ingresso e la pressione di uscita sono differenti e quindi la pressione media è inferiore a quella della pressione arteriosa del circolo sistemico.

Il secondo parametro su cui si basa la capacità di filtrazione è che il peso della pressione oncotica è molto basso rispetto alla pressione idrostatica per cui si tiene di poco conto in condizioni fisiologiche. Si ha una pressione oncotica nel sangue che passa nel filtrato glomerulare, una pressione oncotica dell'interstizio, che è prossima allo zero, quindi si ha un differenziale alto che dovrebbe favorire il recupero di acqua e soluti all'interno del capillare. Ma ho un differenziale di pressione idrostatica che è sempre superiore. Il risultato è che in un capillare glomerulare ho sempre le condizioni che favoriscono un elevato flusso in uscita. Questo determina l'**ultrafiltrazione**.

Però c'è un'ulteriore variabile che è la costante di ultrafiltrazione che è definita essenzialmente da due componenti:

1. La <u>permeabilità</u> che è determinata dalla struttura anatomica e dall'architettura del glomerulo. Corrisponde alla facilità con cui l'ultrafiltrato passa dal lume vascolare all'interstizio, cioè la capsula di bowmann.
2. <u>Superficie filtrante</u> che corrisponde al numero totale di glomeruli (che è altissimo)

Per avere un'ottimale filtrazione glomerulare devo avere:

- alte pressioni idrostatiche intraglomerulari (superiori alle pressioni oncotiche e alle pressioni tubulari)

- una elevata permeabilità e un elevato numero di glomeruli filtranti.

Se modifico una di queste variabili ottengo una condizione di ridotta capacità filtrante. La fisiopatologia dell'insufficienza renale in molti casi si gioca proprio sulla modulazione in negativo di queste caratteristiche.

Un secondo aspetto importantissimo è la modulazione della filtrazione glomerulare attraverso l'innesco di un meccanismo come quello del sistema dell'angiotensina. Se si ha basso riempimento, bassa pressione, bassi flussi, bassa perfusione dell'arteriola afferente, si ottengono le condizioni per il rilascio di renina e si ha una vasocostrizione postglomerulare. Quello che si determina è che i flussi in uscita (post vasocostrizione arteriolare) avranno pressioni più basse. Agire attraverso il **sistema renina-angiotensina** determina una maggiore capacità di estrazione di fluidi dal glomerulo, e quindi <u>il sangue in uscita ha meno volume e meno pressione idrostatica mentre ha più pressione oncotica</u>.

Una condizione di questo tipo si determina a livello dei vasa recta, cioè i vasi che escono dal glomerulo, circondano il sistema tubulare e creano le condizioni per un drenaggio di fluidi dal sistema tubulare all'interstizio e al sangue (quindi un recupero di acqua e di Na). La conseguenza diretta delle variazioni del circolo intraglomerulare è dovuta al fatto che, quando questo è quantitativamente ridotto per bassa perfusione renale, il meccanismo che si attiva (cioè il sistema renina-angiotensina) e la modulazione emodinamica hanno come conseguenza diretta che il sangue in uscita è più ricco di proteine e ha una pressione idrostatica minore. Quindi il sistema dei vasa recta è il più idoneo a recuperare acqua e Na.

Questo aspetto è importante perché un'insufficienza renale prerenale si caratterizza proprio da bassa escrezione di acqua e Na perché c'è un elevato recupero postglomerulare di acqua e Na.

L'ultrafiltrato ha una concentrazione di Na che è la stessa del plasma. In virtù di meccanismi mediati da trasportatori e scambiatori di Na nel tubulo prossimale e di un differenziale di pressione oncotica molto elevato, nel tubulo prossimale è possibile un elevato recupero di Na. Quindi <u>nel tubulo prossimale avviene il riassorbimento obbligato di Na</u>, cioè tanto più ho generato ultrafiltrato rispetto al volume ematico tanto più ho un elevato recupero di Na. Quindi alta pressione di perfusione e elevati flussi glomerulari determinano maggior flusso tubulare: in termini assoluti un maggior recupero di Na ma in termini proporzionali un minor riassorbimento rispetto al totale nel tratto prossimale. Se invece ho bassi flussi renali di sangue ed elevata estrazione a livello glomerulare (perché ho attivato il sistema dall'angiotensina), il flusso di ultra filtrato in uscita sarà mantenuto, però si creano le condizioni per un riassorbimento prossimale molto elevato.

In condizioni di ipoperfusione renale il riassorbimento prossimale di Na e di acqua arriva al 90% cioè molto di quello che viene filtrato (soluti e acqua) viene recuperato a livello del tratto prossimale. Questo sembra un paradosso, perché il sistema è finalizzato ad eliminare il più possibile

anche in condizioni non ottimali. Il riassorbimento di acqua e di Na aumenta, mentre l'escrezione di altri soluti viene mantenuta perché questi non subiscono lo stesso processo di riassorbimento. Ad esempio la **creatinina** (ottimo biomarcatore di filtrazione glomerulare) non subisce il riassorbimento, così come i **metaboliti con valenza acida** del catabolismo amminoacidico oppure **sostanze tossiche** come la bilirubina. Quindi si dissocia il compito di riassorbimento di acqua e Na da quelllo di eliminare soluti.

Il recupero funzionale che ottengo attivando il sistema renina-angiotensina è finalizzato a mantenere una capacità di secrezione di alcune sostanze ma anche al recupero di acqua e Na. Una condizione, che si avvicina al limite della capacità di autoregolazione oppure che la supera verso il basso (con una condizione di insufficienza renale prerenale da bassa pressione di filtrazione), determina un elevato riassorbimento nel tubulo prossimale (che può arrivare al 90% del volume di Na).

In condizioni di bassa perfusione renale si determina elevata osmolarità nella midollare. Infatti se ci sono bassi volumi ed elevata capacità di riassorbimento, il sistema determina un gradiente di concentrazione di Na molto elevato e una capacità di riassorbimento che viene mantenuta anche nell'ansa di Henle. Quindi anche a livello dell'ansa di Henle il meccanismo fisiologico del recupero controcorrente del Na e la creazione di un gradiente di concentrazione nella midollare di Na sono mantenuti e accentuati (quindi si mantiene una elevata capacità di riassorbimento del Na).

Anche nel tubulo convoluto distale c'è una modulazione di trasportatori e del carico salino (che è relativamente basso quindi poco importante).

Nel tubulo collettore il carico salino è basso in termini assoluti (fisiologicamente circa il 3% che arriva al tubulo distale) rispetto al carico salino complessivo dell'ultrafiltrato, però a questo livello avviene la **regolazione fine del riassorbimento salino** ad opera dell'**aldosterone**. Se ho una condizione fisiologica con secrezione di aldosterone molto bassa, il 3% è un carico salino che viene modulato e riassorbito fino ad avere un'escrezione urinaria quotidiana che è inferiore all'1% del carico salino ultrafiltrato. Però in condizioni di elevata stimolazione del sistema renina-angiotensina si avrà uno stimolo molto forte sulla corticale surrenale nella zona glomerulosa per la sintesi di aldosterone, che agirà determinando un elevatissimo riassorbimento di Na. Pur essendo la concentrazione di Na in condizioni di ipoperfusione molto bassa (inferiore al 3%) si ha eccesso di aldosterone per cui il riassorbimento in questo tratto determina una fuoriuscita di Na che è virtualmente zero.

La capacità di riassorbire il Na condiziona la capacità di riassorbire l'acqua. In condizioni di ipoperfusione renale (emorragia, caduta di pressione per shock, sepsi, disidratazione) quello che accade sarà:

- bassa uscita di acqua

- bassissima uscita di Na, con valori di concentrazione escrete prossime allo zero (meno di 10 millimoli/litro).

Il ruolo dell'**aldosterone** è importante anche se quantitativamente poco rilevante perché determina la quantità di Na nelle urine. Se blocco l'aldosterone in condizioni di ipoperfusione renale il 2-3% è una quantità elevata (se si moltiplica il 2-3% per il totale di Na filtrato si ottiene un numero di moli rilevante. Quindi l'aldosterone pur agendo nel tratto distale in cui è già avvenuto il grosso del riassorbimento è importantissimo perché regola finemente il riassorbimento (se 150millimoli assorbite nella dieta 150millimoli secrete con le urine). Questa fine regolazione è renina-angiotensina-aldosterone dipendente.

Funzioni dell’aldosterone:

1. regola la sintesi e l’espressione dei canali del Na
2. regola l’accoppiamento funzionale con i canali del K, attivando e aumentando l’espressione delle pompe Na/K sul versante basolaterale
3. ha un effetto biogenetico sulla attività e sul numero dei mitocondri, quindi sulla capacità di generare ATP e fornire energia.

L’aldosterone sul tubulo distale ha quindi un effetto a lungo termine.

Un altro aspetto va ricordato nei meccanismi che portano ad un recupero di acqua e di Na nell’insufficienza renale prerenale: la regolazione della secrezione di **vasopressina (ADH)** a livello ipotalamico per effetto della stimolazione di tipo adrenergico. La secrezione di ADH è dipendente dagli osmocettori, quindi dalla concentrazione di Na in una zona dell’encefalo in cui a differenza di quasi tutte le altre porzioni ci sono cellule neuronali esposte al flusso sanguigno. Nell’iperglicemia da diabete l’iperosmolarità data dal glucosio non viene percepita dagli osmocettori.

Il sistema è estremamente fine e sensibile già a base concentrazioni di Na e funziona di continuo in ambito fisiologico. Se però c’è una deplezione di volume consistente, quello che accade è una stimolazione ipotalamica, che avviene attraverso i segnali afferenti che giungono dai barocettori aortici. Questo tipo di segnale determina un integrazione con quello degli osmocettori per cui aumenta la curva di secrezione della vasopressina. Se si ha una diminuzione di volume a parità di osmolarità si ottiena una risposta secretiva. Addirittura determino una secrezione di ADH anche per concentrazione patologicamente basse di Na. La risposta normale a 280millimoli di Na è l’inizio di secrezione di ADH. Se ho una contrazione di volume la risposta secretiva se parte da condizioni di volume subfisiologiche è molto intensa. Questo vuol dire che in condizione di insufficienza prerenale si ha contemporaneamente elevata secrezione di ADH, che agisce a livello del tubulo distale attraverso l’espressione delle acquaporine che determinano passaggio di acqua nell’interstizio, favorito a sua volta dall’elevata osmolarità interstiziale, con recupero di acqua molto elevato.

Questa serie di meccanismi regolatori possono portare a volumi urinari totalmente assenti (**anuria**). In una condizione di questo tipo i soluti che dovevano essere veicolati ed escreti e magari già filtrati non glomerulo non possono essere escreti. Se il volume urinario è inferiore a 500ml/24h sicuramente ho una condizione di ritenzione non solo di Na ma anche di soluti che dovevano essere escreti, con accumulo di sostanze potenzialmente tossiche nell’organismo. In questa condizione si ha diminuzione di volume e attivazione del sistema renina-angiotensina-aldosterone con stimolazione dei barocettori, aumento di ADH, inibizione di una componente potenzialmente protettiva (fattore natriuretico atriale) ed elevatissima ritenzione idrosalina.

La condizione di **ipoperfusione renale** che ha portato la capacità di filtrazione sotto la soglia di autoregolazione causa dei danni che possono essere permanenti. Un individuo disidratato che è in condizione di insufficienza renale prerenale se viene reidratato la sua capacità funzionale di regolazione viene recuperata integralmente. Nell’insufficienza prerenale c’è il concetto di reversibilità, essendo il danno funzionale e non organico. Questo è vero perché l’insufficienza prerenale è una condizione funzionale che arriva ad una sorta di esasperazione di quello che avviene in condizioni fisiologiche, in cui il rene è uscito dal range di autoregolazione e non riesce a mantenere i flussi, l’ultrafiltrato e non riesce a regolare l’uscita di volumi perché non c’è più la condizione di circolo. Quindi sono attivati tutti quei meccanismi che portano ad un’elevata vasocostrizione renale e determinano danno da ipoperfusione. Si ha un’ulteriore vasocostrizione mediata da sostanze (**l’angiotensina**, **l’endotelina**, **trombossani** e altre sostanze generate nel rene

in condizioni di ipoperfusione) che esasperano l'ipoperfusione stessa. Il rene va incontro a danno ischemico.

C'è una convergenza di segnali per cui la vasocostrizione intrarenale diventa eccessiva e provoca danno anziché essere protettiva della funzione glomerulare. Si ha:

- elevato grado di contrazione mesangiale,

- ridistribuzione dei flussi che sono mantenuti nella corticale interna a scapito della corticale esterna e della midollare che vanno in contro a condizioni di grave ipossia

DANNO ISCHEMICO

Nonostante ci siano tentativi di autoregolazione attraverso il rilascio di **eicosanoidi,** i meccanismi di autoregolazione non sono più efficienti e quindi si moltiplica il danno ischemico. Se il tempo passa (per più di 24h il soggetto è disidratato) il danno tende a diventare di tipo organico, da ischemia (anche se il termine è improprio, questo è il termine con cui viene descritta questa condizione, anche se in realtà si tratta di ipoperfusione. I flussi anche se ridotti moltissimo sono mantenuti a livelli molto bassi e non c'è ostacolo meccanico al flusso).

Il **danno ischemico** determina danno endoteliale, la midollare subisce disregolazione della sua concentrazione di soluti e si ha danno tubulare (per l'elevato consumo energetico del tubulo).

L'ischemia midollare si accentua, i tubuli vengono ostruiti dalla morte cellulare delle cellule epiteliali tubulari che precipitano nel lume tubulare e il malfunzionamento tubulare porta alla retrodiffusione dei flussi. Siccome la midollare renale ha un'elevata osmolarità, se si toglie la barriera data dalle cellule tubulari si ottiene una sorta di pareggiamento delle concentrazioni di soluti tra lume tubulare e interstizio. Non c'è più un gradiente e si verifica la retrodiffusione dei flussi. Il risultato è **l'edema interstiziale**: l'ostruzione tubulare determina un aumento della pressione tubulare per cui avviene ulteriormente una riduzione della filtrazione glomerulare. È una condizione questa che immaginate subito se non corretta diventa irreversibile e quindi l'anuria iniziale, che era condizionata dalla bassa pressione di perfusione, è la netta conseguenza di un danno organico che può essere reversibile se corretto in tempi ragionevoli. Ad esempio è una condizione che può avvenire durante un intervento chirurgico (crolla la pressione sistemica, si ha perdita di volume) e se il ripristino avviene in un intervallo di tempo ragionevole, oppure addirittura in presenza di danno parenchimale, si può ottenere un recupero funzionale attraverso rigenerazione tissutale. Non tanto se è distrutta l'architettura ma se sono danneggiati gli endoteli, se si riduce la vasocostrizione l'epitelio tubulare rigenera può esserci il recupero funzionale nonostante ci sia stato un danno organico di tipo ischemico.

Se questo non avviene, il danno organico diviene definitivo e il rene è del tutto non funzionante e si ha una condizione di grave e protratta insufficienza renale che determina una sindrome incompatibile con la vita. Un danno di questo tipo porta alla morte attraverso una serie di meccanismi detti (?).

Nel rene ipoperfuso si determinano, in caso di danno organico, ritenzione idrosalina, disfunzione endoteliale, si determina attivazione piastrinica per effetto dell'alterazione dell'endotelio e della superficie endoteliale e dello stato flogistico. Per cui oltre a questi ci sono fenomeni di microtrombosi del circolo renale, processo infiammatorio e danno dovuto allo stress ossidativo,.

I mediatori principali sono un eccesso dell'attività dell'angiotensina che dalla condizione di ipoperfusione viene fortemente stimolata e che è accompagnata da molti secondi mediatori che sono moltiplicatori del danno da angiotensina. Se si mantengono i livelli di angiotensina alti avviene la sintesi di **endotelinina** che determina formazione a livello endoteliale di perossinitriti e ROS, rilascio di trombossani, eicosanoidi, responsabili del danno organico che determina un'irreversibile capacità di mantenere i filtrati e quindi una condizione di stato uremico.

L'angiotensina agisce come meccanismo di progressione del danno in condizione di ipoperfusione. Uno degli aspetti più caratteristici è che fisiologicamente, ma anche nelle fasi iniziali di insufficienza renale (che è caratterizzata da livelli di gravità variabile), se c'è forte stimolazione del sistema dell'angiotensina, questa agisce sulla funzione glomerulare determinando un incremento della quota di ultra filtrato rispetto al totale del plasma presente. Questo è misurabile avendo un'idea del filtrato glomerulare (120ml) e della portata renale (600ml) plasmatica: permettono di determinare un rapporto detto **frazione di filtrazione**. In condizioni fisiologiche è 20%. In una condizione di forte stimolazione del sistema renina-angiotensina cresce perché viene mantenuto un filtrato anche in condizioni di bassa pressione di perfusione e di bassa portata renale plasmatica (sale a 40%). Questo è un aspetto caratteristico perché esprime una condizione di ipoperfusione in cui il sistema renina-angiotensina riesce ad essere funzionalmente efficace come adattamento funzionale. L'aumento della frazione di filtrazione comporta di per sé che il sangue in uscita sia più concentrato, con meno acqua e meno Na, però più proteine (bassa pressione idrostatica e alta pressione oncotica). Il risultato è un drenaggio di Na in tutte le porzioni del rene (soprattutto nel tubulo prossimale). Il sistema di trasporto è fortemente attivato perché il segnale dell'angiotensina determina anche maggiore efficienza e maggiore espressione dei trasportatori del Na. In più nel tubulo distale si determina rilascio di aldosterone e quindi il sistema è portato ad operare il recupero di acqua e Na (in presenza di un filtrato abbastanza stabile nel contenuto). Se si scende sotto il range di autoregolazione il sistema esaspera il recupero di acqua e Na e l'ipoperfusione attraverso il segnale angiotensina è responsabile di un danno che diventa irreversibile (danno ischemico).

L'insufficienza renale prerenale è estremamente comune perché è presente in tutti i soggetti con insufficienza cardiaca (in genere nella forma meno grave). Ad esempio:

- Se c'è secondaria disidratazione in uno scompensato, come ad esempio nel caso di eccesso di uso dei diuretici, si determina un'improvvisa precipitazione dell'insufficienza renale con le caratteristiche dell'insufficienza prerenale, correggibile se ripristino i volumi.

- l'età anziana stessa molto spesso porta alla disidratazione, perché la sensibilità al Na viene persa, la trasmissione del segnale all'osmolarità da una sensazione di sete, e l'anziano beve meno di quanto dovrebbe.

- un soggetto che sia in condizioni di anestesia, o abbia una condizione di perdita di coscienza, o un soggetto del tutto dipendente dai volumi somministrati, può andare facilmente incontro ad un'insufficienza renale prerenale.

- La cirrosi epatica, blocco intestinale, in pratica le sindromi da compartimentazione, situazioni in cui arriva meno flusso sanguigno ai reni e quindi si ha condizione di ipoperfusione.

- Le condizioni di ipovolemia, soggetto anziano che assume un diuretico va incontro a disidratazione. Un bambino che abbia iperpiressia e che non sia idratato va incontro rapidamente a grave disidratazione e quindi ad insufficienza renale.

-	La diarrea, il vomito. Sono condizioni di insufficienza renale che si verificano con estrema facilità perché c'è patologia cronica con bassi livelli di perfusione tissutale, o perché c'è una transitoria disidratazione. Il monitoraggio della funzione renale è quasi sempre obbligatorio in tutti i pazienti delicati, soprattutto bambini e anziani. È una delle condizioni di danno che può diventare gravissimo e irreversibile se non corretto, per questo molto importante dal punto di vista clinico.

DOMANDA: Come mai l'**anestesia** da ipoperfusione? Perché il soggetto ha una condizione di alterato controllo vasomotorio. Inducendo l'anestesia la pressione tende a decrescere e bisogna espandere i volumi durante l'intervento chirurgico per mantenere la pressione di perfusione. Se questo non è fatto o se ci sono perdite di volume improvvise, dato che non c'è nessun meccanismo di segnale oppure i segnali sono alterati c'è ipoperfusione. L'anestesista deve monitorare pressioni e funzione cardiocircolatoria.

Una condizione di insufficienza renale prerenale può essere aggravata dall'uso di **farmaci che bloccano la capacità autoregolatoria del rene**. Se uso potenti farmaci anti-ipertensivi (che sono inibitori dell'attività o del rilascio di angiotensina 2) la capacità autoregolatoria del rene viene persa subito. Per cui se c'è una deplezione di volume in un soggetto che abbia un blocco del sistema renina-angiotensina si ottiene una riduzione di filtrazione glomerulare. In condizioni fisiologiche non da nessun problema, ma in questo caso è una condizione di ipoperfusione che può precipitare in una condizione di insufficienza renale prerenale.

Gli **antinfiammatori non steroidei** bloccando la sintesi di prostaciclina bloccano la capacità di sintetizzare renina determinano un blocco della sintesi di prostaciclina per cui i fenomeni vasocostrittivi intrarenali si accentuano, il rilascio di renina viene ulteriormente bloccato e si ha un'accentuazione del danno ischemico, alterazione della funzionalità del tubulo, prevalgono i meccanismi di ritenzione idrosalina e si ha un basso output urinario legato alla modificazione della filtrazione glomerulare e della perfusione renale.

La **ciclosporina** che è un farmaco molto usato come immunosoppressivo. Determina un'attivazione del segnale da endotelina principalmente. Ha molti meccanismi tossici, meno evidenti se si usano concentrazioni basse come avviene adesso. Nelle prime utilizzazioni nei pazienti che avevano avuto un trapianto renale o cardiaco era la comparsa rapida di ipertensione e di insufficienza renale più la concentrazione di danno ischemico evidenziato attraverso un'attivazione del sistema di segnale di endotelina e da trombossano.

Danno renale perenchimale

Un secondo modello patologico di insufficienza renale è quello anch'esso frequente è la patologia intrinseca del rene, ossia il **danno renale**. Le cause più comuni di danno renale siano legate essenzialmente al danno ischemico. Però ci sono altri meccanismi più selettivi che possono determinare un danno renale:

1. Processo infiammatorio che coinvolge in maniera selettiva alcune strutture glomerulari può determinare un difetto di funzione glomerulare, quindi un difetto di filtrazione, anche senza che ci sia un interessamento di altre strutture.

2. Processo infiammatorio dell'interstizio, pur non colpendo direttamente né glomerulo né tubulo renale può determinare una grave alterazione della funzione perché sostanzialmente modifica le pressioni e la funzionalità del glomerulo e del tubulo.
3. Sostanze tossiche, che il rene filtra. Raggiungono il tubulo renale in elevatissime concentrazioni ed esplicare lì il loro effetto tossico. Certi farmaci vengono in forma attiva o metabolizzati per via renale: l'azione di alcuni metaboliti è fortemente tossica e le cellule più esposte all'azione di alcune sostanze (es. metalli pesanti) sono le cellule epiteliali del tubulo renale e quindi possono avere danno selettivo (non vengono impegnate altre strutture però questo determina nel tempo una condizione di insufficienza renale). Provoca ischemia o ipoperfusione della midollare renale e determinerà la morte delle cellule epitelio tubulari.
4. Ostruzione tubulare, che avviene a livello delle vie escretrici (e questa appartiene alle cause di insufficienza postrenale), come nel caso della **deposizione di acido urico**, quando la sua concentrazione aumenta, nei tubuli. Oppure può avvenire all'esterno dei tubuli nelle vie escretrici, determinando un fenomeno ostruttivo delle vie escretrici e quindi un danno indiretto su tutta la funzione renale.

Nell'insufficienza renale intrinseca tutte le porzioni e tutte le funzioni renali possono essere compromesse. Quando poi in realtà si va a valutare in termini quantitativi il grado di compromissione renale il riferimento è sempre la filtrazione glomerulare, perché inevitabilmente se io ho un danno tubulare o un danno interstiziale quello che subisce una variazione verso il basso è la filtrazione glomerulare.

Le più comuni situazioni che possono portare a danno parenchimale:

- Danno ischemico, già visto, causa ipoperfusione, che è una condizione persistente, ed è frequentemente causa di un danno non solo glomerulare ma soprattutto di un danno organico perché le cellule subiscono danno. È una delle cause più comuni.

- Danno tossico tubulare, da farmaci o altre sostanze che hanno elevata tossicità intrinseca

- la glomerulonefrite, che indica un'infiammazione del glomerulo. Può essere molto selettivo come processo, spesso associato con meccanismi immunoallergici, che coinvolge le cellule dell'endoteliocapillare, il mesangio, che hanno la capacità di determinare un filtro selettivo per la funzione glomerulare.

- La nefrite interstiziale, cioè il processo infiammatorio a carico dell'interstizio che è comune nelle malattie autoimmuni e nelle infiammazioni allergiche e in reazioni idiosincratiche ai farmaci e accentua spesso il danno ischemico.

Condizioni che possono portare a un danno specifico organizzato a livello glomerulare

(*decrive rapidamente la struttura del glomerulo, Ndr*)

Le cellule dell'endotelio hanno ampia capacità di filtrazione. C'è una quota di proteine che lega fisiologicamente il filtrato. Un ruolo fondamentale nelle selettività è data dai podociti. Le cellule del mesangio hanno una funzione di supporto ma anche sono cellule contrattili quindi possono regolare la superficie filtrante.

Il processo infiammatorio che si localizza a livello glomerulare è un evento abbastanza comune e può essere determinato dal fatto che nell'endotelio glomerulare, in virtù dell'alta pressione di perfusione, possano precipitare gli immunocomplessi, o possa esserci un processo infiammatorio specificamente diretto verso le componenti del glomerulo (cellule epiteliali, membrana basale), oppure ci possano essere processi che determinano localmente un infiammazione che coinvolge prevalentemente la struttura vascolare (vasculiti o endoteliti). La selettività è in genere elevata nella localizzazione del danno ma possono essere relativamente selettive.

Si può avere un processo di vasculite, di infiammazione, o un processo infiammatorio sistemico (una malattia che genera la formazione nel vaso di immunocomplessi, che possono precipitare perché c'è una condizione di emodinamica favorente) oppure ci possono essere anticorpi diretti contro la membrana basale delle cellule endoteliali. Quello che accade è che viene attivato il sistema del complemento, viene attivata la risposta infiammatoria e i meccanismi di diretta autoimmunità con una risposta di danno cellulare, alterazioni fenotipiche e morte cellulare. Oltre all'attivazione di una risposta infiammatoria, una risposta cellulo mediata spesso accompagna questi meccanismi, per cui il danno tende ad essere persistente, i granulociti rilasciano ROS dando danno ossidativo, richiamano citochine e chemochine. Il processo molto spesso anziché risolversi tende a cronicizzare e si ha incremento delle cellule del mesangio, persistente danno con morte dei podociti, danno alle cellule endoteliali (che si determina sia acutamente che nelle fasi croniche). Determinano una riduzione dei glomeruli che sono funzionalmente disponibili.

Se c'è un processo che occlude completamente e porta a compromissione della capacità di essere permeabile ai fluidi avrò una riduzione della superficie filtrante. La pressione idrostatica nell'insieme non è ridotta, spesso si verifica ipertensione come meccanismo secondario di risposta al danno perché ho una condizione di alterazione della circolazione intrarenale e spesso si ha un'alterazione del sistema renina-angiotensina,. La bassa capacità di eliminare soluti determina un aumento della ritenzione idrosalina che si traduce in un incremento di pressione arteriosa.

La capacità di mantenere un filtro nei confronti delle proteine può essere mantenuta o può alterarsi (dipende dell'entità del danno all'interno dei podociti a livello della membrana basale), ma quello che si determina nelle forme classiche di glomerulo nefrite è che rispetto al totale dei glomeruli a disposizione un certo numero inizia ad essere indisponibile perché occupato dalla regione infiammatoria e da un danno che porta a fibrosi del tessuto , con una riduzione complessiva della superficie filtrante e della permeabilità del glomerulo.

La selettività della capacità di filtrare senza far passare proteine può essere persa . Uno degli aspetti caratteristici dei processi di questo tipo è che, essendo il glomerulo invaso da cellule infiammatorie ed essendo presenti fenomeni di diapedesi, è possibile ritrovare nelle urine cellule infiammatorie e soprattutto globuli rossi per un danno della integrità di parete e quindi un passaggio di cellule.

Le cause del danno immunomediato possono essere:

- Gli anticorpi verso antigeni cellulari

- La deposizione di immunocomplessi

Il danno immunomediato porta ad un processo che può risolversi dopo una fase acuta con buona risoluzione (come nelle vasculiti microvascolari in cui una marcata risposta di tipo infiammatoria iniziale ha determinato alterata funzione endoteliale, con un ripristino in tempi rapidi di una normale funzionalità endoteliale e glomerulare). In altre condizioni, come la deposizione di immunocomplessi nel lupus, si determina un processo cronico che porta alla formazione dei così dette semilune, ossia una proliferazione di cellule mesangiali al di fuori del glomerulo sufficienti a determinare un gravissimo danno alla permeabilità glomerulare e anche ad un'obliterazione del lume.

Alcune volte il danno glomerulare presenta aspetti più peculiari. Ad esempio la sindrome nefrosica, soprattutto nella forma a (?) è una condizione per la quale la permeabilità della membrana basale è alterata, con minime alterazioni strutturali, l'adesione dei podociti a livello della membrana basale è modificata e si ha una perdita di podociti che sono recuperabili anche nelle urine. Questo determina un'aumentata permeabilità del glomerulo alle proteine, che può essere così marcata da determinare una diluizione della concentrazione delle proteine nel plasma. L'immissione in circolo di albumina da parte del fegato è inferiore alla quota che vedrete esserci normalmente nelle urine. Quindi si determinano le condizioni per le quali la concentrazione di albumina nel sangue decresce.

La filtrazione è alterata, nel sangue la concentrazione di altre proteine plasmatiche tende a ridursi e aumenta proporzionalmente la concentrazione di proteine di alto peso molecolare ,per cui si modifica la concentrazione relativa di alcune sostanze. Ad esempio fibrinogeno e lipoproteine tendono ad aumentare in concentrazione,mentre si perdono proteine a basso peso come la transferrina, l'albumina ed è la più evidente situazione di danno nefrosico, cioè da alterata permeabilità glomerulare. È una condizione che può accompagnare l'infiammazione glomerulare ma può verificarsi anche in condizioni di apparente danno minimo. L'aspetto caratteristico di queste forme è che la capacità di mantenere una selettività di membrana a livello glomerulare è persa, perché viene persa la funzione e il numero dei podociti. Inoltre ad essere alterata molto spesso è la struttura intrinseca della membrana basale, che in condizioni come le forme di nefrosi che accompagnano malattie proliferative e patologiche come quelle del mieloma, dove si ha deposizione di catene di immunoglobuline a livello della membrana basale (che è alterata) e la proteinuria. Questa diventa uno degli aspetti caratteristici, prima ancora del danno alla capacità filtrante. Nella forma pura è una condizione relativamente meno frequente di altre però è molto importante perché accompagna altre patologie renali o si manifesta in forma intrinseca.
Spesso però si complica in una serie di conseguenze dovute alla perdita di alcune componenti del plasma. L'albumina decresce quindi si altera il potere oncotico del plasma. Questo a livello della filtrazione glomerulare ha poca importanza (perché c'è sempre un gradiente di concentrazione) però è un pochino alta.

SINDROME NEFROSICA

Quello che è più evidente è ciò che accade a livello del circolo periferico, dove la capacità di recupero nella porzione venulare dei capillari viene persa e può portare ad edema interstiziale. La **sindrome nefrosica**, che è quella condizione che accompagna il danno glomerulare, è caratterizzata dalla presenza di edema oltre ad altri fenomeni come lo stato discoagulativo (per cui c'è una tendenza alla trombosi, alla formazione di coaguli , alla coagulazione intravascolare disseminata o alla formazione di trombi venosi) perché altera il rapporto di concentrazione dei fattori della coagulazione, con elevate concentrazioni di fibrinogeno. Si può avere modificazione dei flussi

distrettuali perché ci sono più bassi di volumi ematici perché la quota di trasudato a livello periferico aumenta e quindi tendenzialmente c'è basso volume di riempimento arterioso (una condizione che favorisce anche l'attivazione del sistema renina angiotensina e la progressione del danno renale da angiotensina, un meccanismo che porta anche un ulteriore danno glomerulare).

La sindrome nefrosica può essere una situazione stabile o meno e può accompagnare un processo infiammatorio (in questi casi tende ad essere reversibile).

Un danno irreversibile che però non è rapido nell'insorgenza è quello che si verifica nel diabete e nell'ipertensione arteriosa. In questo caso il danno è un'espressione a livello renale del danno vascolare che si ha nel microcircolo in associazione a queste due patologie.

Nel diabete ci sono molti stimoli per cui la cellula endoteliale è disfunzionante:

- la glicemia elevata,

- la produzione di fattori contenenti prodotti ossidati,

- alterazioni della catena di segnali intracellulari (per effetto del sorbitolo che si genera) e quindi l'alterazione di altre vie di segnale legate all'insulina

Tutto questo converge nella disfunzione endoteliale con un aumento dei segnali a favore di un processo di fibrosi della parete vascolare. Nel microcircolo può portare alla **microangiopatia diabetica**, che è caratterizzata dalla deposizione di materiale extracellulare all'esterno del capillare e quindi causa un danno che porta alla proliferazione cellulare e all'occlusione del lume.

Un altro meccanismo che sembra avere un ruolo importante nella genesi del danno glomerulare del diabete e che è comune con l'ipertensione arteriosa è il fatto che le alterate capacità regolatorie dei flussi intrarenali determina spesso una condizione di eccessiva pressione intraglomerulare. Questo è facilmente comprensibile nell'ipertensione arteriosa: più elevati livelli di pressione sistemica determinano stress di parete maggiore e i segnali trasdotti dall'endotelio portano fenomeni di rimodellamento vascolare. Questo è visibile anche nel microcircolo. La stessa cosa accade nel diabete dove l'incapacità di autoregolare i flussi distrettuali nel rene sembra essere responsabile di una condizione di iperfiltrazione per aumentata pressione glomerulare. Questo sarebbe uno dei meccanismi per cui il glomerulo è esposto a danno nel diabete.

Statististicamente:

1. La nefropatia diabetica è una condizione estremamente comune ed è in assoluto la prima causa di insufficienza renale di tipo parenchimale per danno vascolare e glomerulare.
2. L'ipertensione arteriosa è la seconda causa di danno glomerulare e di insufficienza renale.

Nel diabete e nell'ipertensione arteriosa il danno non è istantaneo anche se in realtà nella grave ipertensione arteriosa la progressione di danno renale può essere accelerata.

Lezione di Patologia generale e fisiopatologia clinica (sem2) del 22/4/2013 (1)

Prof. Cassatella

Sbobinatore: Andrea Montresor

Revisore: Mariagiovanna berton

(inizia parlando di lezioni extra il 2 e il 9 maggio, dalle 12.30 alle 14.

Poi dice che il primo appello è fissato per il 4 giugno (più 5 e 6-7; si riprende non la settimana successiva ma dal 17. Il secondo appello circa il prima luglio).

Nella prima parte andrò veloce, dirò un sacco di cose che Berton ha già spiegato. Stavamo parlando delle classi di oncogeni, proteine che derivano da alterazioni molecolari di geni che codificano ad esempio per fattori di crescita e per recettori per fattori di crescita.

Un'altra classe di oncogeni codifica per proteine importanti nella trasduzione del segnale, che regolano la proliferazione e anche processi di differenziazione e i rapporti con altre cellule, che sono varie.

Questa tabella vi fa vedere oncogene mutato che codifica per una proteina di trasduzione.

Magari questa proteina di trasduzione, così mutata, funziona in maniera incontrollata, magari il fattore di crescita attiva, attraverso il recettore, una trasduzione...(lascia incompleta la frase, "*questa slide non c'entra un fico secco, si riferisce a un oncogene alterato che codifica questo recettore per fattore di crescita", n.d.R.*).

Una categoria di geni che possono diventare oncogeni è quella che codifica per le piccole proteine che legano il GTP (GTP monomeriche); sono tante e appartengono a varie famiglie. Nel caso dei tumori riguarda soprattutto dei membri della famiglia Ras,sono tre codificate da tre diversi geni (H-Ras, K-Ras, N-Ras), che svolgono varie funzioni e sono trasduttori importanti dei recettori per fattori di crescita.

Quindi Ras, fra le mille cose che può fare, agisce positivamente sui meccanismi che inducono la proliferazione cellulare, e funziona in varie maniere.

Per esempio (vedi slide RAS --> Proliferazione cellulare), indirettamente, può controllare la sintesi della citochina TFG-α, il Transforming Growth Factor, che può legare alcuni membri della famiglia di recettori per EGF (Epidermal Growth Factor).

TFG-α in alcune cellule può attivare una risposta mitogenica, cioè con aumento della proliferazione; Ras può controllare positivamente la sintesi di questo fattore di crescita.

Se Ras funziona in maniera continua e incontrollata determina la sintesi incontrollata del TFG-α.

Ras è implicato anche in una serie di vie di trasduzione, tra le quali alcune che attivano direttamente la mitogenesi.

Vedete uno schema, che dimostra che Ras è in grado di integrare il segnale che viene attivato non solo da fattori di crescita ma anche da altre condizioni: integrine, ad esempio; oppure da recettori immuni, o recettori che attraversano 7 volte la membrana plasmatica e attivano una cascata di trasduzione, che a un certo punto attiva Ras.

Ras a sua volta è in grado di innescare la cascata di alcune MAPK (protein chinasi), le quali si attivano e vanno ad attivare fattori di trascrizione bersaglio, che legano geni target con attivazione della proliferazione.

Figura che illustra ancora altre azioni di Ras, importante per la proliferazione, per la trascrizione; in certe cellule può attivare la via della PI3K, che ha una serie azioni a valle che vanno dalla inibizione dell’apoptosi alla stimolazione della proliferazione e della sintesi proteica.

Ras può anche attivare una via importante per il movimento e l’emissione di estensioni della membrana citoplasmatica (formando filipodi, lamellipodi...).

Andando più nel dettaglio, guardate quante cose può fare Ras, a seconda del tipo di cellule e dello stimolo che la cellula subisce.

Questo illustra cosa succede nel caso il Ras si alteri dal punto di vista funzionale come conseguenza di alterazioni geniche che lo trasformano in un oncogene e quindi come conseguenza si ha alterazione della proliferazione, della progressione del ciclo, del citoscheletro, della motilità; tutta una serie di proprietà alterate che la cellula tumorale maligna acquisisce e che fanno sì che la cellula tumorale maligna diventi in grado di:

-non interagire più con le cellule del tessuto da cui origina:

-diventare autonoma;

-infiltrare tessuti e muoversi fino a dare metastasi (segno distintivo dei tumori maligni).

Ras è quindi implicato nei processi di traduzione, nel controllo dell'apoptosi, nell'interazione tra varie cellule regolando per esempio le giunzione cellulari etc etc.

Come funziona Ras:

-Ras è una piccola proteina che allo stato inattivo lega il GDP, poi, quando la cellula riceve un segnale da parte di un recettore che attiva questa via, il Ras libera il GDP e lega il GTP, attivandosi e acquisendo la capacità enzimatica per attivare tutte le vie di trasduzione a valle.

Questo processo di attivazione del Ras termina perché il GTP legato a Ras viene idrolizzato: Ras ha attività GTPasica intrinseca. Ras rimane quindi legato al GDP, tornando allo stato inattivo.

Questo ciclo è regolato da proteine capaci di potenziare l’attivazione del Ras o indurne la disattivazione.

(*slide con sequenza di aminoacidi NdR*) Nel caso di Ras, basta una singola mutazione per trasformare questo protoncogene in oncogene; i protoncogeni sono geni normali, che quando si alterano dal punto di vista molecolare può acquisire attività oncogenica.

Nel caso di Ras quindi basta una singola mutazione di una base che cambia la sintesi di un aminoacido da Glicina a Valina, per rendere Ras incapace di idrolizzare il GTP (persa la capacità GTPasica).

La conseguenza è che Ras lega continuamente il GTP senza nemmeno uno stimolo esterno, rimanendo sempre attivo,facendo danni. C’è quindi attivazione incontrollata della via delle MAPK.

Come dicevo l’altra volta, Ras è stato il primo oncogene per cui si è verificato che una singola mutazione diventa responsabile di questa trasformazione.

Tabella con tumori umani in cui è possibile individuare mutazioni di questo oncogene. Mutazioni di Ras sono frequenti in tutti i tipi di tumori; è molto facile riscontrare (dal 10 al 90% in vari tipi di tumori) a un certo punto della progressione neoplastica, una mutazione di Ras.

Questa figura fa vedere la struttura e i domini, che conosciamo perfettamente; Ras è stato anche cristallizzato.

Qua vedete alcune forme attive con mutazioni puntiformi; anche delezioni possono trasformare Ras da protoncogene a oncogene.

Come già sapete, il ciclo di Ras è regolato molto finemente da stimolatori che attivano Ras (GEFs), e da inibitori, cioè proteine che favoriscono l'attività GTPasica e quindi spengono questa via (GAPs).

Un'alterazione genica del Ras lo trasforma in oncogene; la proteina GAP invece, siccome blocca l'attivazione di Ras, funzionano come oncosoppressori.

Esistono situazioni in cui si ha perdita della funzione della proteina GAP e quindi Ras, mancando il freno, rimane sempre attivo.

Nell'ambito della cascata di trasduzione del segnale da parte di Ras si possono individuare vari componenti (*vedi slide: Trasduzione del segnale da parte di Ras e trasformazione neoplastica NdR*): in rosso ci sono gli oncogeni,recettori che legano fattori di crescita e che hanno attività Tyr-chinasica intrinseca, che poi attivano Ras; Ras a valle attiva una serie di vie di trasduzione che possono comprendere proteine che acquisiscono attività oncogenica; i verdi sono regolatori negativi di questo sistema perchè spengono la via positiva (NF1 è una GAP, con attività oncosoppessoria).

Ras è un esempio di proteine di trasduzione che possono diventare oncogeni. Esistono tanti altri trasduttori del segnale che possono acquisire attività oncogenica quando il relativo gene viene alterato dal punto di vista molecolare; sono tante proteine:

- enzimi (Ras, PLCγ, Tyr-chinasi citoplasmatiche, per esempio membri della famiglia del Src, la PI3K, Tyr-fosfatasi che invece funzionano come oncosoppressori perché defosforilando le proteine bersaglio inibiscono la loro azione)
- proteine adattrici

In generale, una famiglia importante sono le protein-chinasi, enzimi in grado di fosforilare proteine bersaglio quando si attivano; normalmente si trovano allo stato inattivo, poi quando arriva un segnale la protein chinasi si attiva e acquisisce attività enzimatica, andando a fosforilare proteine bersaglio.

L'azione enzimatica delle protein chinasi viene spenta dalle protein fosfatasi, che defosforilano le proteine bersaglio o le stesse protein chinasi.

Le protein chinasi possono diventare oncogeni, mentre le protein fosfatasi invece funzionano come oncosoppressori.

Esistono diversi tipi di protein chinasi, a seconda dell'aminoacido che viene fosforilato abbiamo chinasi che fosforilano in Serina, in Treonina (in realtà le chinasi che fosforilano in Ser lo fanno anche in Thr), e poi le Tirosin-chinasi.

Rispettivamente abbiamo le Serin-fosfatasi, le Treonin-fosfatasi, le Tirosin-fosfatasi.

Qui ci sono esempi di varie Tirosin-chinasi:

- chinasi dipendenti dall'aumento del cAMP
- chinasi dipendenti dall'aumento del cGM
- chinasi dipendenti dalla caTena leggera della miosina
- chinasi Calcio-dipendenti
- protein chinasi C di vario tipo
- tirosin-chinasi; nel caso dei tumori sono molto studiate e importanti per l'attività oncogenica.

Nell'ambito dei tumori riconosciamo le Tyr-chinasi che sono parte dei recettori e legano fattori di crescita, e poi le Tyr-chinasi citoplasmatiche, che fungono da trasduttori e spesso vengono reclutate da parte di recettori che non hanno un dominio intracellulare con attività chinasica.

Quando si sono studiati i tumori, si è visto che il pattern delle proteine fosforilate in Tyr nei tumori rispetto alle cellule normali è drammaticamente elevato. Si è quindi capito che nei tumori c'è una alterata attivazione di Tyr-chinasi.

Le Tyr-chinasi citoplasmatiche a loro volta si possono suddividere in :

- appartenenti alla famiglia del Src: oltre a Src, che è il prototipo, anche ZAP-70, Btk, Csk, Abl
- altre chinasi citoplasmatiche che hanno scarsa omologia col Src: Jak (che media il segnale delle citochine) e altre ancora.

Le Tyr-chinasi vanno a fosforilare una serie di proteine bersaglio che sono coinvolte in funzioni fondamentali per quanto riguarda il metabolismo della cellula. In particolare fosforilano (*legge la slide Tab. 33.15, n.d.R.*):

-proteine coinvolte nella trasduzione del segnale, quindi amplificano il segnale di trasduzione: Recettori, PLC, Ras, chinasi come Raf

-proteine del citoscheletro: lipocortina (*Domanda*: cos'è? *Risposta:*) inibisce la fosfolipasi A2, bersaglio dei glucocorticoidi; (*poi Cassatella aggiunge*:) lega la fosfolipasi A2 e la mantiene attiva. Il glucocorticoide induce l'espressione della lipocortina in modo che inibisca la PLA2, bloccando la cascata degli eicosanoidi

-enzimi citosolici: della glicolisi (quindi enzimi che forniscono energia alla cellula), chinasi ribosomiali (quindi enzimi che favoriscono la traduzione), altre chinasi citosoliche;

-segnali ed enzimi nucleari: fattori di trascrizione soprattutto, cicline (importanti per il ciclo cellulare), istoni (tengono la conformazione della cromatina).

Prototipo di questa famiglia di Tyr-chinasi implicate nei tumori è Src.

Il Src ha una determinata struttura quando è nella forma protoncogenica, cioè quando è c-Src (“c” vuol dire protoncogene); possiede a livello del dominio C-terminale un residuo di tirosina che normalmente è fosforilato e che è in grado di legare il dominio SH2... in poche parole di mantenere il Src in forma inattiva; nella cellula Src è ripiegato.

Quando arriva il segnale, si attiva una cascata di trasduzione che porta alla defosforilazione di questa tirosina per cui Src perde la sua conformazione e acquisisce la sua attività enzimatica.

Nei tumori (studiando il meccanismo responsabile della trasformazione neoplastica da virus nel sarcoma di Rous) si è visto che in Src si trova deleta questa regione. Questo dominio,questa tirosina, ha quindi azione negativa perché mantiene inattivo Src; Src perde la capacità di ripiegarsi e, indipendentemente dal fatto che ci sia uno stimolo o no, si attiva.

Src è in grado di fosforilare una serie di bersagli, per esempio proteine implicate nei meccanismi di adesione cellula-cellula, proteine che hanno attività docking, cioè che favoriscono l’interazione fra vari trasduttori, proteine adattatrici, GEFs, altre chinasi etc.

Il Src sempre attivo mantiene funzionali una serie di vie di trasduzione molto importanti per i meccanismi di regolazione del movimento, adesione, sopravvivenza e proliferazione; queste funzioni perdono il loro controllo.

Nella figura è disegnato un fibroblasto trasformato: i fibroblasti normali, quando vengono messi in coltura, hanno la capacità di aderire al substrato quindi quando vengono piastrati hanno la capacità di attaccarsi e ricoprire la superficie di una piastra di coltura; i fibroblasti trasformati perdono questa loro morfologia, diventano cellule rotondeggianti, e perdono la capacità di aderire a un substrato e quindi, invece di rimanere attaccate, iniziano a rimanere in sospensione.

Le cellule trasformate hanno perso i meccanismi di controllo che servono alla cellula per farla interagire con un substrato e fra di loro. Le cellule si staccano, tendono addirittura a respingersi. Perchè? per tanti motivi: nel caso in cui ci sia Src attivato, questi fosforila in maniera continua e incontrollata componenti fondamentali per la placca di adesione di una cellula normale e fa sballare tutta la struttura del citoscheletro e quindi la cellula perde la capacità di rimanere adesa.

Src non è l’unico, ci sono altre proteine, per esempio FAK, sempre membro della famiglia delle Src chinasi, che sono implicate nella organizzazione molecolare della placca focale di adesione.

Effetti sul citoscheletro dell'abnorme stato di fosforilazione associato a un guadagno di funzione di una tirosin-chinasi che acquisisce attività oncogenica, per esempio il Src.

Il disegno riguarda le interazioni che due cellule normali hanno in un tessuto (per esempio cellule della mucosa, ciliate): se c'è attività incontrollata del Src, queste placche di adesione, giunzioni, meccanismi di adesione al substrato e alla superficie si perdono, quindi viene persa la morfologia di quel determinato tessuto, la cellula si distacca dal substrato, si stacca dalla cellula vicina, cambia forma, acquisisce la capacità di muoversi, infiltra il tessuto etc.

Tutte queste alterazioni contribuiscono al fenotipo di una cellula tumorale maligna, che si esprime in tante maniere e che progredisce man mano che passa il tempo.

Rappresentazione schematica dei meccanismi medianti i quali l'ECM e fattori di crescita possono influenzare la proliferazione cellulare, la motilità, il differenziamento e la sintesi proteica.

Vedete una cellula che interagisce con l'ambiente ("ambiente" non sono solo i fattori di crescita prodotti da altre cellule o in maniera autocrina che regolano la proliferazione, ma anche lo stroma, cioè l'ambiente in cui la cellula si trova).

Queste interazioni possono avvenire in maniera diversa, per esempio possono essere mediate dalle integrine, che possono essere in grado di legare proteine della matrice e quindi essere influenzate, dal punto di vista della funzione della cellule, e mediare segnali di trasduzione, regolati da membri della famiglia di Src.

Anche l'ambiente attraverso le integrine può regolare le risposte cellulari, proliferazione e differenziamento, capacità di muoversi, adesione e variazione di forma.

L'esempio di Src è paradigmatico, come modello di tirosin chinasi che diventa oncogene, ma sono tantissimi gli oncogeni e l'apparato di trasduzione collegabile all'attività tirosin chinasica.

In questa tabella (Table 12.2) vedete elencate proteine che possono acquisire proprietà antigenica; alcune le conoscete già.

- Recettori che hanno attività tirosin chinasica: abbiamo parlato del Fms (codifica il recettore per il fattore di crescita per CSF-1/M-CSF), la variante oncogenica si chiama Fms; l'alterazione oncogenica di questo recettore produce leucemia, perché il Fms è espresso da cellule mieloidi.

c-Kit lega l'SCF (Stem Cell Factor), quindi (una sua mutazione) induce sempre una

leucemia; è recettore per il fattore di crescita per i mastociti.

- Tirosin chinasi di tipo non recettoriale: abbiamo parlato di Src.

Un’altra è Abl, di cui parleremo trattando le conseguenze delle aberrazioni cromosomiche; una di queste è molto importante perché la conoscenza alla base di questa traslocazione ha portato addirittura alla sintesi di un farmaco specifico capace di curare la malattia è la traslocazione 9-22, che interessa un membro della famiglia Src, cioè Abl. Si forma una proteina chimerica, di fusione, per cui Abl perde una struttura regolatoria e acquisisce attività enzimatica incontrollata.

- Altro pathway oncogenico è la via Akt/PKD; vi ricordo l’importanza di questa via, che viene dalla PI3K, in grado di attivare una serie di vie di trasduzione a valle. Akt ha una serie di azioni biologiche, per esempio è in grado di favorire l’angiogenesi, e attraverso l’inibizione di Bad, di inibire l’apoptosi.

La via Akt/PKD può influenzare la sopravvivenza, la proliferazione e la crescita cellulare attraverso una serie di azioni molecolari; quali sono i meccanismi attraverso cui questa via di trasduzione Akt/PKD inibisce l’apoptosi? Agisce a valle su una serie di bersagli, per esempio:

-fosforila Bad, proteina con attività proapoptotica che viene inibita dalla fosforilazione,

-inibisce l’attività della caspasi 9,

-inibisce la IkB chinasi

-fosforila MDM2, che lega la p53

Questa via può anche attivare la proliferazione, andando a fosforilare bersagli che hanno attività antiproliferativa, e in questa maniera inibisce; favorisce quindi la crescita.

Questa via di trasduzione è controllata negativamente da una fosfatasi, che si chiama PTEN; conosciamo una serie di tumori umani, come carcinoma (tumore maligno delle ovaie), tumore maligno delle cellule della glia, tumore maligno della mammella e così via; in questi si possono riconoscere alterazioni che riguardano il sistema Akt/PTEN, che favoriscono la proliferazione e la sopravvivenza cellulare. Da una parte ci sono mutazioni dell’inibitore, per cui questo non funziona più, oppure alterazioni positive con over espression che porta a un’aumentata attività funzionale di questo sistema.

Alla fine si ha un aumento della proliferazione e un’inibizione dell’apoptosi, in seguito ad alterazioni molecolari di questo sistema.

Altra categoria di oncogeni:

- geni che codificano per fattori di trascrizione importanti per l’attività trascrizionale di geni bersaglio e favoriscono la proliferazione.

Vedete disegnato un locus di un gene X, con alcuni meccanismi di controllo dell’espressione; il sito di partenza della trascrizione per opera delle RNA-polimerasi, controllato da fattori di trascrizione

specifici che devono legare particolari sequenze; l'RNA trascritto poi dovrà essere processato per originare la proteina.

Ci sono poi regioni che possono potenziare la trascrizione di un gene,"enhancers", sia a livello del promotore ma anche all'interno del gene o a valle del gene stesso; tutte queste regioni possono legare fattori di trascrizione capaci di influenzare positivamente la trascrizione.

Se c'è una mutazione in un oncogene che codifica per un attivatore della trascrizione?

Se c'è una mutazione nel gene che codifica per una proteina attivatrice della trasduzione, questa entra nel nucleo e si avrà una stimolazione inappropriata della risposta cellulare per attivazione della trascrizione; immaginiamo che ci sia una mutazione in un fattore di trascrizione che lo rende incapace di esser degradato; questo si lega alle regioni bersaglio e, non essendo possibile inattivarlo, quello attiva sempre la trascrizione.

Un altro esempio che spiega l'azione incontrollata di un fattore di trascrizione è l'amplificazione, cioè un aumento del numero di copie dello stesso gene; nella figura è riportato il MYC, fattore di trascrizione chiave per la cellula che regola la proliferazione cellulare e che in seguito a modificazioni di tipo homogeneous ---(*non capisco la parola, n.d.R.*) region, porta alla formazione di piccoli cromosomi. La conseguenza sarà un aumento della sintesi del MYC, quindi di una proteina normale, ma invece che essercene una copia ce ne sono magari 100.000; aumento quantitativo.

Il MYC è un esempio di fattore di trascrizione oncogenico, che può essere amplificato in certi tumori, il suo aumento quantitativo si ha in questa patologia che è il linfoma di Burkitt, in cui una delle alterazioni molecolari tipiche è una traslocazione cromosomica che interessa il MYC.

Il MYC si trova a livello del cromosoma 8; il linfoma di Burkitt è un tumore maligno del sistema linfatico (linfoma) di tipo B, che rimane localizzato in linfonodi, milza e organi linfatici secondari. Riguarda le cellule B, che sono i linfociti che producono in maniera specifica gli anticorpi, che quindi hanno promotori molto forti che regolano la trascrizione delle catene delle Immunoglobuline molto forti.

Nel linfoma di Burkitt vengono colpiti i cromosomi 8 (dove si localizza il MYC), e per esempio il 14 (ma anche il 22 e il 2, cioè regioni in cui si trovano geni che codificano per le catene, o pesanti o leggere, delle immunoglobuline). Il MYC, in seguito alla traslocazione, si va a giustapporre al promotore delle immunoglobuline, prendendo il controllo della trascrizione, e produce una trascrizione incontrollata del MYC.

Come risultato si avrà un aumento incontrollato della sintesi del MYC.

Il MYC è l'esempio di un gene che codifica per un fattore di trascrizione con attività oncogenica paradigmatico, perché si può determinare un aumento della sintesi e quindi della quantità di questa proteina, che può essere normale o alterata.

Sono tanti i meccanismi molecolari che portano alla trasformazione da proto-oncogene a oncogene: o l'amplificazione, cioè l'aumento del numero di copie del MYC (aumento quantitativo di una

proteina normale), o la traslocazione cromosomica (MYC finisce vicino al gene che codifica per le Ig, che nei linfociti B è molto forte e quindi attiva molto la trascrizione), o l'azione trasformante dei virus.

Può succedere (*il prof dice che ne parlerà più in dettaglio in seguito, n.d.R.*) che un virus a RNA con capacità trasformante, quando infetta una cellula, si inserisca vicino al MYC e ne prenda il controllo della trascrizione. I virus a RNA hanno, a livello del 3' e del 5' le sequenze LTR (Long Terminal Repeat), che fungono da enhancer o da promotori; se il retrovirus va nelle vicinanze del proto-oncogene, ne amplifica l'espressione (aumento quantitativo).

Ancora, altra possibilità che può interessare il MYC è un altro dei meccanismi utilizzati dai retrovirus per trasformare una cellula ed è la "transduzione virale", e consiste nell'acquisizione, da parte di questo virus, di un proto-oncogene cellulare che lo acchiappa e lo inserisce nel proprio genoma, lo muta trasformandolo in oncogene, si parla in questo caso di v-MYC; quando il virus va a infettare un'altra cellula ha nel proprio genoma un gene di origine cellulare che è diventato oncogene, dove si esprime in maniera incontrollata facendo danni.

(*Figura 7.8*) Come funziona il MYC? Lavora insieme ad altri membri della famiglia (importanti sono MAX e MAD); in un linfocita normale MAX si può eterodimerizzare o con MAD o con MYC, a seconda dello stato di attivazione della cellula, per cui quando si lega a MAD (MYC rimane libero e non lega più MAX), il complesso MAD-MAX mantiene una trascrizione repressa; quando MYC si complessa a MAX, perché arriva un segnale positivo o per altre ragioni, si forma il complesso che è in grado di attivare la trascrizione. Nel linfocita normale c'è questo equilibrio, che cambia a seconda dello stato funzionale del linfocita.

Invece, in un linfocita B tumorale-linfomatoso, per esempio come conseguenza della traslocazione che avviene nel linfoma di Burkitt, nella cellula si avrò una maggiore quantità di MYC espresso, e per forza di cose MAX andrà a legarsi a MYC; in questa cellula tumorale si formano necessariamente questi complessi per cui si ha una continua trascrizione dei geni bersaglio di MYC. C'è un aumento ddell'espressione quantitativa di MYC che sposta la bilancia a favore della formazione dei complessi MAX-MYC, con alterazione della regolazione di MYC.

MYC è in grado di attivare da una parte proliferazione, dall'altra (attraverso tutta una serie di azioni) inibisce la differenziazione.

Una delle caratteristiche delle cellule tumorali maligne è da una parte la proliferazione incontrollata, e dall'altra la perdita della differenziazione, che può essere a vari livelli. Ci può essere una cellula maligna ben differenziata, come una cellula maligna altamente indifferenziata, quasi irriconoscibile rispetto al tessuto o alla cellula da cui deriva.

Come concetto generale, una cellula tumorale più prolifera meno è differenziata.

Ci sono tutta una serie di funzioni che sono regolate dal MYC, e sono associate alla trasformazione; i geni bersaglio di MYC sono implicati nell'attivazione del ciclo cellulare, nella differenziazione (che viene repressa), nella crescita, nel metabolismo e nella sintesi proteica, nei meccanismi di

adesione e di migrazione; può influenzare la produzione di radicali liberi all’ossigeno, determinare instabilità dei cromosomi.

Un’altra caratteristica delle cellule neoplastiche maligne è la cosiddetta” instabilità genetica”: quando una cellula tumorale si trasforma e progredisce, da un punto di vista genetico è molto instabile per varie ragioni, per cui più progredisce più, nel tempo, a causa dell'instabilità genomica, acquisisce nuove alterazioni genetiche, che aumentano la sua malignità.

Il MYC può interessare capacità di rinnovamento della cellula staminale e della trasformazione. Vedrete con calma le funzioni legate all’azione del MYC e quali sono i geni bersaglio di MYC che le mediano.

Per quanto riguarda il ciclo cellulare, ad esempio, il MYC aumenta la sintesi alcune cicline e chinasi dipendenti da cicline.

Vedete alcuni oncogeni che appartengono alle categorie di cui stiamo parlando, quindi

-fattori di crescita, sis, che codifica per la catena del PDGF;

-recettori per fattori di crescita;

-proteine di trasduzione;

-Ras;

-membri della famiglia di Src (proteine di trasduzione di varia natura);

-proteine adattatrici;

-Ser/Thr chinasi;

-fattori di trascrizione: myc, rel (“Cos’è rel?” *Nessuna risposta*), fos, jun

Domanda: il fatto che uno dei fattori sia ritrovato su tutti i tumori è perché la mutazione di uno di questi qua è sufficiente a dare un forte stimolo verso la trasformazione tumorale, o perché sono zone del DNA più sensibili, più portate a mutare? *Risposta*: Ammettiamo che la probabilità di mutazione sia uguale per tutti i geni: se c’è mutazione in un gene non oncogeno non succede “nulla”, se invece riguarda un proto-oncogene succede qualcosa. Quindi la domanda non sussiste; in generale, i proto-oncogeni non sono più predisposti ad alterazioni molecolari, semplicemente se avviene una mutazione molecolare di un gene cruciale responsabile di determinati fenomeni che fanno scattare la trasformazione si avranno conseguenze, altrimenti no.

Tranne alcuni esempi quindi i proto-oncogeni non hanno probabilità maggiore di subire mutazione, in certe cellule come traslocazione cromosomica del linfoma di Burkitt.

La trasformazione neoplastica è un processo che avviene a tappe, quando la cellula in quel determinato tessuto e momento acquisisce un numero di alterazioni molecolari che interessino geni che codificano per oncogeni, oncosoppressori, geni che inibiscono l'apoptosi, tutti nello stesso momento, allora la cellula si trasforma. Questo modello è stato dimostrato sperimentalmente, i ricercatori hanno trovato la maniera di transfettare le cellule, metter dentro 1, 2, 3...capendo qual è la combinazione minima per trasformare la cellula in vitro.

Ci sono molte eccezioni; la trasformazione da parte dei virus dei modelli animali basta per trasformare la cellula.

Abbiamo parlato di altre categorie, geni che codificano per proteine che possono diventare oncogeni.

Geni che codificano le cicline e le chinasi cicline-dipendenti sono molto importanti per la progressione del ciclo cellulare, ne sono i regolatori, che vengono indotti da fattori di trascrizione, per esempio il Myc; ovviamente, anche questi possono diventare oncogeni.

Ci sono un certo numero di tumori (molti più di quanti ne mostri questa diapositiva) umani di varia natura, in cui è possibile riscontrare oncogeni che codificano per la Ciclina B, la Ciclina E e le chinasi Ciclina dipendenti, in seguito ai soliti meccanismi molecolari di trasformazione oncogenica (traslocazione, amplificazione, iperespressione, mutazione puntiforme).

Le proteine sono attivate dalle vie di trasduzione attivate dai fattori di crescita, che a finire su fattori di trascrizione e che vanno a finire su fattori che inducono alla fine la trascrizione delle cicline (hanno una trascrizione transiente, che serve a modulare una sola fase del ciclo cellulare); ci sono poi i regolatori negativi che agiscono sulle cicline e soprattutto sulle chinasi Cicline dipendenti, e questi a loro volta fanno parte delle vie di trasduzione attivate da inibitori della proliferazione. Funzionano quindi come oncosoppressori.

Oggi ci sono molti composti farmacologici che vanno a bloccare le chinasi ciclino-dipendenti, nel tentativo di sviluppare farmaci specifici capaci di bloccare la proliferazione, usati in trials contro vari tipi di tumori (queste conoscenze quindi hanno anche un risvolto applicativo dal punto di vista farmacologico).

Proteine che prevengono l'apoptosi: non voglio perdere troppo tempo; possono funzionare come oncogeni. "Infer-apoptosis" (*non capisco cosa dica, n.d.R.*) rappresenta uno degli step principali

che porta allo sviluppo di un tumore maligno; il classico oncogene implicato nella regolazione del blocco dell'apoptosi è Bcl-2, e i Bcl-2 like proteins, che posso promuovere la tumorigenesi.

Altra figura che illustra l'importanza della perdita del controllo dell'apoptosi nello sviluppo del cancro; quando c'è un'alterazione genetica a livello del DNA intervengono immediatamente i meccanismi di riparazione, ma se questi falliscono l'alterazione genetica viene mantenuta e trasmessa alle cellule figlie, col fenomeno dell'instabilità genomica, che se va a colpire proto-oncogeni li fa diventare oncogeni.

La cellula come meccanismo di salvaguardia, quando c'è instabilità genomica in seguito a un danno al DNA, la cellula che ha perso i meccanismi di riparazione è mandata in apoptosi. Interviene la p53 che innesca reazioni molecolari che mandano la cellula in apoptosi.

Piuttosto di mantenere alterazioni a livello del DNA, se la p53 è presente, la cellula va in apoptosi; se invece la p53 è alterata questo meccanismo di salvaguardia è perso e c'è una "disruption of apoptosis signaling", con maggior probabilità di sviluppare il tumore.

Il controllo dell'apoptosi è un fenomeno fondamentale per la patogenesi della trasformazione neoplastica.

Ricordo che ci sono via intrinseca ed una via estrinseca, i vari regolatori (proteine che da una parte favoriscono e dall'altra impediscono).

Proteine che possono funzionare da oncogeni sono inibitori dell'apoptosi e sono membri della famiglia Bcl-2(prototipo) ed altri ancora.

Bcl-2 è il prototipo della famiglia di proteine che favoriscono la sopravvivenza, assieme a Bcl-xl, Bcl-1, Mcl-1, etc.

Ci sono poi membri della famiglia di Bcl-2 che però hanno attività proapoptotica, quindi responsabile dell'induzione dell'apoptosi cellulare.

Figura con tutti i players che regolano positivamente e negativamente la morte cellulare.

Esempio di una condizione di trasformazione cellulare legata all'attivazione oncogenica di una di queste proteine è legata a un'alterazione di Bcl-2: questi è un gene che può diventare oncogenico, responsabile della patogenesi dei Linfomi a Cellule B (da qui il nome Bcl-2; tumore maligno dei linfociti B).

I tumori delle cellule eritropoietiche sono sempre maligni: linfomi e leucemie, non scordatelo, sono sempre maligni.n

Bcl-2 previene l'apoptosi; può succedere che ci sia attivazione, per cui c'è aumento incontrollato dell'espressione di Bcl-2. I segnali che causano la morte cellulare sono bloccati, e come risultato c'è un'inappropriata longevità cellulare, che in associazione ad altri eventi favorisce la proliferazione.

Come mai l'aumentata sintesi di Bcl-2 blocca l'apoptosi? Discorso analogo a quello fatto prima dei Myc: il Bcl-2, a seconda della quantità in cui è presente all'interno della cellula, può od omodimerizzare (quando c'è formazione di omodimeri c'è il blocco dell'apoptosi), oppure quando ci sono livelli controllati, Bcl-2 può formare eterodimeri con Bax e formare una proteina inattiva; quando c'è poco Bcl-2, si formano omodimeri Bax-Max che stimolano l'apoptosi.

Si ha una specie di equilibrio fra omodimeri di Bcl-2 e omodimeri di Bax, che stimolano l'apoptosi; quando c'è tanto Bcl-2 allora la bilancia si sposta verso la formazione di omodimeri di Bcl-2, quindi si ha l'accumulo di cellule e la promozione dell'apoptosi.

Abbiamo esempi di alterazioni che riguardano i geni che controllano l'apoptosi, quindi alterazioni antiapoptotiche, che possono riscontrarsi in cellule tumorali umane.

Possono esserci alterazioni molecolari, che possono codificare una serie di geni, implicate nel controllo dell'apoptosi che possono alterarsi e alla fine promuovono il blocco dell'apoptosi.

Vedete vari tipi di tumori umani in cui queste alterazioni si possono riscontrare.

Abbiamo parlato del Bcl-2, quindi overespressione di Bcl-2, in una certa percentuale dei tumori umani, tipica del linfoma a cellule B.

Alterazione della PI3K, che porta ad attivazione di Akt e PKD (nei tumori gastrointestinali), e che possono bloccare l'apoptosi di queste cellule.

"TNF Receptor 1 methilation", se ricordate il recettore di tipo primo per il TNF media la morte cellulare perchè ha il "Death Domain"; possiamo avere un meccanismo epigenetico (metilazione sul genoma a caso), una metilazione del locus che codifica per questa proteina, in cui si ha una repressione della trascrizione di questo gene per NFAT e bloccata possibilità di mandare in apoptosi la cellula (*non capisco senso/sintassi, n.d.R.*).

"Bax mutations": Bax è una proteina che, al contrario di Bcl-2, attiva l'apoptosi; quando c'è mutazione, non c'è più produzione di questa proteina e viene perso un meccanismo per mandare la cellula in apoptosi.

Ultima tabella, riassume quanto detto nelle ultime due lezioni, principali proto-oncogeni, classificati in base alle funzioni dei loro prodotti (fattori di crescita, recettori di membrana, recettori nucleari, proteine G etc etc).

Lezione di Patologia generale e fisiopatologia clinica (sem2) del 23/4/2013 (1)

Patologia Cassatella 23/04/2013

MECCANISMI DI TRASFORMAZIONE NEOPLASTICA UTILIZZATA DAI VIRUS

Ci sono dei virus capaci di determinare dei tumori negli animali, nell'uomo abbiamo una forte associazione tra sviluppo in senso tumorale e infezione virale.

Abbiamo virus a RNA e a DNA entrambe le categorie possono causare tumore ma i meccanismi dei virus a RNA sono in parte diversi da quelli a DNA.

VIRUS a RNA (retrovirus)

Individuiamo una serie di generi di virus con attività oncogenica in varie famiglie (α,β,γ,δ,ε) che provocano:

>tumori ematopoietici come i linfomi

>carcinomi (tumori maligni della pelle)

>sarcomi (tumori maligni del tessuto connettivo)

Abbiamo poi gli spumavirus che sono oncogeni in alcune specie e i lentivirus, che inducono infezioni ad andamento molto lento, tra cui troviamo il virus HIV (esso non causa direttamente lo sviluppo di tumori ma lo favorisce causando immunodeficienza).

Ricordiamo il ciclo replicativo dei virus a RNA:

Il virus infetta la cellula, l'RNA viene retrotrascritto in una molecola di DNA dalla trascrittasi inversa, poi questo DNA va a integrarsi come provirus nel genoma della cellula infettata, il virus replica e infetta una nuova cellula.

I virus a RNA sono molto semplici dal punto di vista genomico avendo 3 geni:

-GAG codifica per le proteine del core

-POL trascrittasi inversa

-ENV copertura del virus

si aggiungono le sequenze LTR “long terminal repeat” che si trovano sia al 5’ che al 3’.

Queste sequenze controllano la trascrizione dei tre geni fungendo da promotori o da enhancer in modo molto potente.

Partendo da queste conoscenze, lo studio permise la scoperta dell’esistenza di geni che portano alla trasformazioni delle cellule in senso tumorale. Venne studiato per primo sul sarcoma di pollo (sarcoma di Raus).

Un ultrafiltrato derivato dallo spezzettamento del sarcoma di pollo era in grado di indurre un nuovo sarcoma, quindi Raus ipotizzò che la causa dell’induzione del tumore fosse un virus, dimostrando che questo ultrafiltrato era in grado di causare tumore in vitro se le cellule venivano infettate con questo virus.

Si è trovato sequenziando la sequenza genomica, che questi virus a RNA trasformanti oltre ai soliti geni tipici possedevano altro materiale genetico che probabilmente era responsabile della mutazione.

Il passo successivo fu la scoperta che questo materiale genetico corrispondeva ad un gene endogeno della cellula ospite SRC.

Ci sono tre meccanismi usati dai virus per portare mutazioni in senso tumorale nelle cellule:

1)MECCANISMO DELLA TRASDUZIONE VIRALE:

Meccanismo specifico dei virus a RNA.

L’infezione da parte di un virus a RNA che viene retrotrascritto, il DNA retrotrascritto si inserisce nel genoma della cellula, se questo provirus va a inserirsi vicino a cSRC al momento della trascrizione del materiale genetico del virus che vuole replicare può succedere che la trascrittasi oltra a trascrivere il DNA virale trascriva anche cSRC, o una sua parte, e quindi alla fine il genoma virale sarà formato dai 3 geni del virus più un gene che proviene dalla cellula.

Questo processo può provocare una seria di modificazioni del proncogene; quando poi questo viene inserito nel genoma virale diventa vSRC(viralSRC).

Alla fine avremo un virus che ha acquisito un oncogene che verrà introdotto nella nuova cellula che viene infettata trasformandola.

Il protooncogene nel processo di acquisizione può cambiare ma è possibile che resti anche uguale.

Il materiale genico inserito nel DNA della nuova cellula produrrà quindi degli mRNA virali, che possiedono in più vSRC, in quantità elevata ed incontrollata che causano quindi la trasformazione della cellula.

Così un virus non trasformante acquisisce la capacità oncogena.

Quindi l'oncogene presente nei virus a RNA trasformante non è un gene che essi possiedono normalmente ma un gene acquisito da una cellula ospite e poi mutato.

?perché il protooncogene catturato dal virus diventa oncogenico?

!La trascrizione del genoma virale che viene inserito nel DNA ospite non è precisa ma può determinare una serie di errori o non essere completa e quindi trascrivere solo una parte del protooncogene e quindi alla fine abbiamo un gene che codifica per una proteina deleta; oppure causa delle mutazione e alterazioni genetiche; così anche come tutto il processo di maturazione e processamento dell'mRNA possono portare ad errori!

Gli oncogeni virali si definiscono vONC e corrispondono a una forma mutata del protooncogene in cui spesso mancano porzioni che possono portare alla delezioni di sequenze di controllo cellulare o modificare la conformazione della proteina (delezione della porzione finale – SRC).

Il protoncogene di ERB differisce per una delezione del dominio extracellulare che mantiene inattivo il recettore in assenza del ligando, mancando questa porzione il recettore si attiva in maniera spontanea.

Si sono quindi identificati una serie di oncogeni virali che hanno una controparte nel repertorio genetico della cellula: RAS, ABL, SRC, MIC, ERB, RAF …

Gli oncogeni sono stati scoperti anche cercando di capire quali fossero i geni alterati nei tumori, con le tecniche di sequenziamento del DNA è stato possibile isolare dalle cellule tumorale con tutta una serie di passaggi descritti nella slide.

È stato possibile isolare e sequenziare questi geni e si sono riscoperti molti dei geni che erano già stati scoperti mediante la trasformazione virale.

Questo meccanismo ha portato anche alla scoperta di oncogeni che non si erano trovati nei precedenti esperimenti ovvero con la trasduzione del DNA.

?quali sono i meccanismi utilizzati dai virus a RNA per trasformare una cellula?

2)MUTAGENESI INSERZIONALE

Non è specifico dei retrovirus a ma condiviso anche dai virus a DNA.

Il DNA che deriva dal RNA di un retrovirus inserito a livello del genoma della cellula ospite se va vicino a un protooncogene questo inserimento fa sì che le sequenze LTR prendano il controllo del protooncogene bersaglio attivandone la trascrizione; quindi portano ad un aumento quantitativo della produzione della proteina che può essere normale oppure deleta o alterata.

MIC, ERB, RAS, P53…

3)TRANSATTIVAZIONE

Si riferisce a un solo virus a RNA (HTLV-1 associato all'induzione di un tumore umano, una leucemia acuta dei linfociti T).

Oltre a gag, env e pol possiede materiale genetico in più che codifica per TAX, una proteina virale, che va ad attivare NFkB che può favorire la sopravvivenza, riattivare il ciclo cellulare efunziona da fattore di trascrizione legando il promotore dell'IL2 e IL15 e dei loro corrispettivi recettori (IL2 favorisce la proliferazione dei linfociti T).

La prima tapa della trasformazione è dovuta a TAX ma poi intervengono altri fattori che portano alla trasformazione in senso tumorale.

Si attivano oncogeni e non si disattivano oncosoppressori!

TRASFORMAZIONE DA PARTE DI VIRUS A DNA

Virus a DNA possono essere associati a trasformazione neoplastica

-epatovirus posso determinare tumori maligni del fegato quindi carcinoma epatocellulare

-papovavirus (polioma, papilloma, SV 40) in modelli animali possono causare tumori solidi maligni, carcinomi di origini epiteliali o papillomi (tumori beningi)

-adenovirus vari tumori solidi

-herpesvirus linfomi, sarcomi e carcinomi

-poxvirus fibromi

In questo caso la capacità trasformante di questi virus è diversa da quella a RNA.

Normalmente abbiamo un ciclo litico della cellula infettata dal virus ma può succedere delle volte che la cellula sia “non permissiva” ovvero non permetta la replicazione del virus a DNA.

Le cellule non permissive sono cellule che mancano di qualche fattore importante per le fasi di replicazione del virus, il genoma virale può quindi integrarsi nel DNA dove rimane silente o può trasformare la cellula.

Il meccanismo in questo caso la cellula viene trasformata grazie a proteine codificate dal genoma virale.

il virus con queste proteine interferisce nella cellula portando ad un aumento della replicazione virale, solo che nelle cellule non permissive queste proteine vanno a interagire con alcuni importanti oncosoppressore come la proteina pRb e P53.

Queste proteine virali legano fisicamente queste proteine con attività oncosoppressoria inibendo la loro attività.

La proteina Rb ha attività inibitoria sul ciclo cellulare infatti in forma ipofosforilata lega dei fattori di trascrizione importanti per la proliferazione cellulare; quando arriva un segnale di stimolo proliferativo della cellula Rb viene iperfosforilata e quindi fa si che questi fattori si liberino dal legame e si uniscano ai promotori attivando il ciclo.

Queste proteine virali legano la proteina Rb impedendole di legare i fattori e quindi fungono da inibitori dell’azione inibitoria di Rb.

?quali sono i meccanismi molecolari attraverso i quali si perde la funzione degli oncosoppressori?

!non solo meccanismi di modificazione dal punto di vista genetico o epigenetico che fanno si che l’oncosoppressore non venga più trascritto o sia mutato, ma esiste anche un altro meccanismo legato alla presenza delle proteine dei virus a DNA che agiscono legando e inibendo l’oncosoppressore!

Lo stesso TAX che abbiamo visto prima può interagire con Rb e quindi da una parte attiva la proliferazione e dall’altra blocca il freno della cellula.

P53 inattiva il ciclo cellulare indirettamente legando P21 che è un inattivatore del ciclo, o può indurre l’apoptosi.

(ripetizione generale dei meccanismi)

Queste proteine ad esempio nel papilloma virus vanno a legare fisicamente la P53 e Rb allora viene persa la funzione di questi oncosoppressori.

Questi virus a DNA come abbiamo già visto possono:

trasformare la cellula con proteine codificate dal loro genoma, mentre quelli a rna lo facevano mediante il meccanismo della trasduzione con oncogeni che derivano dalla cellula ospite.

Il secondo concetto e la funzione di queste proteine a DNA che sono in grado di legare gli oncosoppressori inibendoli, con perdita della funzionalità degli oncosoppressori indipendente da modificazioni genetiche e epigenetiche.

Queste proteine virali possono anche influenzare altre risposte cellulari implicate nella trasformazione, influenzando l'apoptosi.

Possono anche complessarsi con proteine codificate dal protoncogene e attivarle, con interazione proteina-proteina per inattivare gli oncosoppressori o per attivare proteine della cellula come Src.

2)MUTAGENESI INSERZIONE

Anche nel loro caso questi virus possono andare a inserirsi vicino a un protooncogene e attivarlo come succede per i virus a RNA.

Per quanto riguarda la correlazione tra mutazione in senso neoplastica e infezione virale per tumori umani il concetto è che l'infezione di per sé non è sufficiente a causare tale mutazione ma intervengono altri fattori.

Tabella 14.1. Virus umani sospettati di svolgere azione

Virus	Patologia infettiva	Neoplasi
Virus a DNA		
Epstein-Barr (EBV)	Mononucleosi infettiva	Linfoma Carcinom Morbo di Linfomi T Leiomios Adenoca
Papilloma 16,18,33 HPV-16/18/33)	Verruche e condilomi	Carcinom distretto
Epatite B (HBV)	Epatite	Epatocar
Herpesvirus 8 o 9* (KSHV)	Ipertensione polmonare primaria, iperplasia angiolinfoide	Sarcoma primari d malattia (varietà p
Jamestown Canyon** (JCV)	Leucoencefalopatia multifocale progressiva	Tumori g
Virus a RNA		
Epatite C (HCV)	Epatite	Epatocar
Leucemia T (HTLV-1)	Paraparesi spastica tropicale, uveite (HUV)	Leucemi Linfomi T Micosi fu di Sezar

?quali sono i meccanismi molecolari responsabili della attivazione dei protooncogeni in oncogeni?

-trasduzione

-mutazioni (puntiformi –RAS)

-mutagenesi inserzionale

-amplificazione (aumento del numero di copie di un determinato gene)

-aberrazioni cromosomiche, soprattutto traslocazioni cromosomiche, per cui avremo un’alterata regolazione di una proteina normale (MIC) oppure come conseguenza di proteine chimeriche.

-interazioni proteine-proteine (SRC)

-microRNA(un determinato microrna che dovrebbe determinare il blocco della traduzione di un mrna che codifica per un oncogene manca)

Table 6 **Mechanisms of activation of proto-oncogenes**

Mechanism	Genetic and biochemical consequences	Examples
Transduction	insertion of exons of a proto-oncogene into a retrovirus genome, usually with truncations or internal mutations of coding sequences, causing efficient production of an abnormal protein	v-*src*
Point mutation	altered sequence and biochemical function of protein product	c-Ha-*ras*
Insertion mutation	augmented production of mRNA and protein, via promoter or enhancer in LTR; sometimes accompanied by truncation, fusion, or point mutation of coding sequences	c-*myc*, *int-1*
Amplification	augmented production of mRNA and protein via increased gene dosage	N-*myc*
Chromosomal translocation	altered regulation of expression, sometimes with creation of hybrid proteins	c-*myc*, *abl-bcr*
Protein-protein interaction	stabilization and altered biochemical function	pp60$^{c\text{-}src}$ and middle T Ag
Mancato o ridotto intervento di microRNA	Carcinoma polmonare Leucemia linfatica cronica B Tumori mesenchimali benigni	Ha-RAS BCL-2 HMGA2

ONCOSOPPRESSORI

Differenza oncogeni e oncosoppressore

Gli oncogeni si comportano come acceleratori della crescita quindi è sufficiente una singola modificazione dal punto di vista genetico, risulta dominante perché provoca un aumento/acquisizione della funzione.

Per gli oncosoppressori abbiamo “2 freni” se uno non funziona, possiamo usare l’altro ma se entrambi sono mutati non si può più frenare.

Funzionano come freni per la proliferazione cellulare e servono due mutazioni per portare a una perdita della funzione.

?come si è arrivati all’idea che esistono dei geni che hanno azione oncosoppressoria?

!una seria di osservazioni sperimentali che hanno mostrato che oltre ad esistere geni che attivano la proliferazione, probabilmente esistono molecole con funzione opposta.

Si è postulata la loro esistenza osservando un esperimento che consisteva nel fondere cellule tumorali con cellule normali formando delle cellule ibride che all’inizio si comportavano come cellule normali, almeno all’inizio, quindi si è supposto che le cellule normali avessero la proprietà di sopprimere o inibire i geni delle cellule tumorali con cui erano state fuse.

Questa ipotesi è stata avvalorata quando andando a studiare il comportamento di questi ibridi si notava che queste cellule dopo un determinato periodo tornavano a manifestare il fenotipo tumorale; questo cambiamento era associato alla perdita di materiale genetico (cromosoma 11).

La prova definitiva è stata data quando prendendo il materiale genetico perso, questo cromosoma 11 e iniettandolo nuovamente nella cellula, questa tornava a manifestare il fenotipo di una cellula normale.

Un altro importante avanzamento è stato fatto da nutzon osservando il retinoblastoma, tumore maligno che si presenta clinicamente con due modalità: una sporadica e una famigliare.

Ci sono due tipi di pazienti o bambini piccolissimi o il tumore si manifesta in tarda età in maniera sporadica.

Nella forma familiare compare in età precoce con forma bilaterale e nell’occhio si possono osservare più foci all’interno dello stesso occhio.

Nella forma sporadica si presenta monolateralmente e in tarda età.

Egli ipotizzò che fosse coinvolto un gene specifico e che per il manifestarsi di questo tumore servisse la perdita o la mutazione del gene sia materno che paterno.

Lezione di Patologia generale e fisiopatologia clinica (sem2) del 24/4/2013 (1)

<u>PATOLOGIA GENERALE E FISIOPATOLOGIA 24/04/2013 -DUSI</u>

Sbobinatore: Francesca Nalin

Revisore: Anna Borghesani

<u>REAZIONE DI FASE ACUTA</u>

La reazione di fase acuta è una risposta dell'organismo correlata all'infiammazione.

<u>CHE COS'E' LA RISPOSTA DI FASE ACUTA?</u>

Per esperienza personale sappiamo che quando stiamo male (per un'infezione, un'infiammazione,..) oltre a danni locali (dolore, rossore, gonfiore) ci sono anche dei danni generali (mal di testa, febbre, spossatezza, inappetenza..). Tutti questi sintomi generici vanno sotto il nome di reazione di fase acuta, ossia la **<u>risposta dell'organismo a livello sistemico</u>**, i cui parametri vengono studiati nella pratica clinica; si differenzia dalla flogosi proprio perché questa è caratterizzata da risposte locali nel punto in cui c'è il danno.

Non bisogna farsi ingannare dal termine "reazione della fase **ACUTA**": il termine acuto non vuol dire che si applica solo all'infiammazione acuta, ma fa riferimento alla <u>rapidità</u> della risposta (in medicina con ACUTO si intende RAPIDO), sia nel caso di un'infiammazione acuta che di una cronica.

Questi eventi, rapidi ed intensi, fanno parte di un <u>meccanismo di difesa</u> messo in atto dall'organismo in seguito a:

- Infezioni batteriche
- Traumi (ferite gravi,ferite chirurgiche [i tessuti danneggiati liberano dei mediatori che attivano tale reazione])

- Tumori (prevalentemente linfoma di Hodgkin e carcinoma renale, sono dei tumori che producono grandi quantità di citochine e mediatori attivanti la reazione di fase acuta)
- Ustioni
- Necrosi tissutale
- Artrite reumatoide (grave infiammazione delle articolazioni con liberazione di grandi quantità di mediatori)
- Reazioni immunologiche

La riposta può essere **transitoria** (limitata alla durata della malattia) o **persistente** (mesi/anni, come nelle malattie croniche), ed è tanto più intensa quanto più intenso è lo stimolo perché segue abbastanza fedelmente l'andamento della malattia, cosa molto importante per la diagnosi del medico.

PRINCIPALI ASPETTI DELLA REAZIONE DI FASE ACUTA

- **Febbre**
- **Leucocitosi** (aumento del numero di leucociti circolanti)
- **Modificazioni del quadro proteico plasmatico**: alcune aumentano, altre diminuiscono con un complessivo aumento della **VES**, acronimo che sta per Velocità di Eritro-Sedimentazione. Una volta era comunemente effettuata negli ospedali, oggi è meno utilizzata e sostituita da altre tecniche. Consisteva nel prelevare sangue da un paziente malato e da uno sano e nell'inserirlo in delle provette graduate, insieme ad un anticoagulante. Lasciando a riposo per un'ora, si poteva poi osservare che i globuli rossi del paziente malato sedimentavano molto più velocemente di quello del soggetto sano. Tale aumento di velocità era dovuto proprio a questi cambiamenti dell'assetto proteico che determinavano nelle modificazioni delle interazioni tra i globuli rossi, con tendenza ad impilarsi e formare "rouleax". Tali aggregati pesavano di più e, di conseguenza, avevano una maggior tendenza a depositarsi sul fondo della provetta.
- **Calo sierico del ferro e dello zinco**, con tendenza all'anemia (anemia sideropenica)

QUESITO: Come mai un'infezione tende a sviluppare anemia?

Verrà spiegato più avanti.

- Aumento sierico del rame (**cupremia**)
- **Bilancio azotato negativo** (sono più le proteine che vengono degradate rispetto a quelle neosintetizzate)
- Aumento della **gluconeogenes**i (sintesi del glucosio dagli amminoacidi)
- **Incrememtata sintesi di vari ormoni**: glucagone (iperglicemizzante), insulina (ipoglicemizzante), ACTH (stimola la produzione cortisolo dal surrene), TSH, T4, T3, aldosterone

- Innesco della **risposta immunitaria** (spia significativa: *ipergammaglobulinemia*)

Tutti questi cambiamenti sono accompagnati da cefalea, inappetenza, astenia, spossatezza, febbre, dolore,.. che malgrado, l'apparenza, rappresentano una strategia difensiva dell'organismo in condizioni di emergenza.

PATOGENEGESI DELLA REAZIONE DI FASE ACUTA

L'insorgenza di tale reazione è dovuta essenzialmente alle cellule della flogosi, ossia **macrofagi, cellule endoteliali, cellule della microglia, cellule NK, neutrofili, fibroblasti, cellule del mesangio renale** (fagocitanti); hanno tutte come capacità comunque quella di produrre **IL-1**, responsabile di tutti i cambiamenti sopra elencati. Sia l' **isoforma α** che quella **β** entrano in gioco nella risposta di fase acuta, ma in seguito allo studio su topi K.O. si è visto che l'IL-1β ha un ruolo predominante.

Ovviamente sono coinvolte anche altre citochine, principalmente **IL-6** e **TNF α**: infatti studi su topi K.O. anche per queste citochine mostrano un deficit nella risposta. E' importante sottolineare che queste ultime possono essere indotte proprio dall'IL-1.

Gli **effetti dell'IL-1** sono:

1. Aumento del set point ipotalamico con induzione della **febbre** per produzione di PGE2(pirogeno endogeno)

-

NB: Le citochine generalmente non passano la barriera ematoencefalica; giunte nel cervello, stimolano i macrofagi meningei, gli endoteliociti dei vasi capillari e la microglia perivascolare a indurre la COX 2 (l'isoforma inducibile) con sintesi di PGE2 che passa la barriera ematoencefalica e va ad agire su diversi centri cerebrali provocando nausea, malessere, inappetenza, vomito. Il centro ipotalamico reagisce come se ci fosse freddo, e attiva tutti quei meccanismi di risposta all'abbassamento di temperatura, come vasocostrizione, contrazione muscolare, aumento della frequenza cardiaca.

Somministrando l'**Aspirina**, blocchiamo l'attività della COX 2 e di conseguenza tutta la sensazione di malessere tipico di un'infiammazione.

LPS o pirogeno esogeno, ha lo stesso effetto dell'IL-1,andando a stimolare anch'essa la COX 2.

1. Stimolo alla maturazione dei leucociti nel midollo osseo (**leucocitosi e neutrofilia**), insieme a **TNF, GM-CSF, IL-3; IL-6, IFN-gamma**.

1. Attivazione della **chemiotassi dei neutrofili** in prossimità dei vasi, con liberazione di **lattoferrina**, che cattura grandi quantità di ferro, il che spiega la diminuzione della sideremia e la conseguente anemia

1. Negli epatociti, l'IL-1 insieme ad altre citochine (Oncostatina M, IL-&,…)inducono l'aumento della produzione delle **proteine di fase acuta** (responsabili dell'aumento della VES) con concomitante diminuzione compensatoria della sintesi di altre proteine, come l'albumina.

1. Nel muscolo, viene stimolato l'aumento del **catabolismo proteico**, il che spiega i dolori muscolari (mialgie) di soggetti affetti da infezioni croniche. Pazienti lungodegenti, infatti, perdono grandi quantità di massa muscolare, sintomo del bilancio azotato negativo. Si può arrivare alla cachessia (dal greco kakòs=brutto, ossia l' abbruttimento dell'individuo che perde massa in seguito a tumori o a malattie croniche). Gli amminoacidi derivanti dal catabolismo del muscolo vengono utilizzati per la gluconeogenesi con conseguente aumento della glicemia.

NB: anche questa modificazione è mediata dall'azione indiretta dell'IL-1 e del TNF sulla COX con produzione di PGE2

1. **Attivazione dei linfociti B** con produzione di **anticorpi** e mediatori quali **IL-2**,citochina autocrina essenziale per la proliferazione dei linfociti T (Th1, Th2, Th17, ovviamente con la collaborazione di altre citochine); a seconda della polarizzazione dei linfociti T, avremo la produzione di diversi pattern specifici di citochine

1. Nel SNC, sempre tramite la PGE2, determina aumento di **ACTH** con conseguente diminuizione dell'appetito (anoressia) e della fase REM del sonno (sonnolenza, perché la REM è quella fase del sonno coinvolta nel recupero delle energie, nella capacità di memoria, di attenzione e di movimenti rapidi oculari).

1. Attivazione della produzione di **insulina** (direttamente), di **glucagone**, di **cortisone** (tramite ACTH); la modificazione dell'assetto ormonale porta essenzialmente ad un aumento della glicemia, ad un aumento dell'utilizzo di glucosio e ad un aumento del cortisolo (forma naturale del cortisone sintetico) con effetto antinfiammatorio.

1. Agisce sui vasi sanguigni **vaso-dilatandoli**, con calo della tensione(ipotensione) e sensazione di stanchezza e spossatezza.

1. Attiva la **proliferazione dei fibroblasti** e la produzione di **collagene**, e quindi i processi di riparazione e cicatrizzazione di eventuali danni

Come si può dedurre,l'IL-1 è una citochina che ha effetti molto vasti, e che partecipa a tutti gli aspetti della reazione di fase acuta (questo spiega gli importanti deficit nei topi KO).

-

-

-

-

CLASSIFICAZIONE DELLE PROTEINE DI FASE ACUTA

Sono tutte proteine prodotte dal fegato, su stimolo citochinico. Vengono classificate secondo 3 parametri (quelle nominate sono solo una piccola parte di tutte le proteine di fase acuta; sono quelle generalmente più importante e di cui si chiede l'esame in laboratorio):

1. **AUMENTO DI CONCENETRAZIONE**

1. Proteine che aumentano del 50%:

1.1.1. Ceruloplasmina (lega e trasposta il rame)

1.1.2. Complemento (C3, C4)

1. Proteine che aumentano di 2-5 volte:

1.2.1. Alfa 1 glicoproteine acida

1.2.2. Alfa 1 inibitore di proteasi

1.2.3. Alfa 1 antichimotripsina

1.2.4. Aptoglobina (lega l'emoglobina liberata dai globuli rossi)

1.2.5. Fibrinogeno (per la coagulazione e sintesi si fibrina)

1. Proteine che aumentano fino a 100 volte:

1.3.1. Proteina C reattiva

1.3.2. Siero amiloide A (SAA, già menzionata nella Amiloidosi)

1. **CINETICHE DEI CAMBI DI COCENTRAZIONE**

1. Proteine che aumentano a 4h dallo stimolo, poi diminuiscono rapidamente con emi-eliminazione a 12-18 ore:

Proteina C reattiva, SAA, Alfa 1 antichimotripsina

1. Proteine che aumentano a 24-48 ore, raggiungono una massima concentrazione a 7-10 giorni e diminuiscono dopo 2 settimane:

Aptoglobina, Inibitori di proteasi, Fibrinogeno,…

NB: Tali proteine sono lo specchio di come evolve una flogosi; l'analisi in laboratorio delle loro concentrazioni permette la stadiazione dell'infiammazione e l'analisi dell'efficacia di una terapia (ovviamente bisogna conoscerne concentrazioni e cinetiche di induzione ed eliminazione)

1. **SULLA BASE DELLE CITOCHINE CHE NE INDUCONO L'ESPRESSIONE (**classificazione più biochimica, nonostante leghino recettori diversi hanno un trans-signaling intracellulare convergente alla sintesi della stessa proteina epatica)

1. TIPO IL-1 (IL-1α, IL-1β, TNFα, TNFβ)

3.1.1. Proteina C reattiva

3.1.2. SAA

3.1.3. Alfa 1 glicoproteina

1. TIPO IL-6 (IL-6, IL-11, oncostatina M)

3.2.1. Fibrinogeno

3.2.2. Alfa 1 antitripsina

3.2.3. Alfa 1 antichimotripsina

3.2.4. Alfa 2 macroglobulina

3.2.5. Aptoglobina

3.2.6. Emopessina

3.2.7. Ceruloplasmina

FUNZIONI BIOLOGICHE DELLE PROTEINE DI FASE ACUTA

-

1. **PARTECIPAZIONE A PROCESSI DIFENSIVI**:

Proteina C reattiva à opsonizzazione, attivazione del complemento

Componenti del Complemento à citolisi, opsonizzazione, chemiotassi, citolisi con complesso d’attacco

Fibrinogeno à emostasi, riparazione dei tessuti

1. **INIBITORI DI SERIN PROTEASI**

Alfa 1 antitripsina,Alfa 1 antichimotrispina,Alfa 2 macroglobulina à controllo delle proteasi leucocitarie rilasciate in seguito a degranulazione, per limitare l'effetto locale ma soprattutto sistemico

Alfa 2 antiplasmina à blocca la plasmina e quindi il processo di fibrinolisi

Inibitore del C1 à controlla l'effetto del complemento

Antitrombina III à controllo della coagulazione

Inibiore della Proteina C (della coagulazione!!!Non si intende proteina C reattiva) à controllo della coagulazione

1. **SCAVENGER DI RADICALI LIBERI DELL'OSSIGENO E PROTEINE DI TRASPORTO**

(determinano l'eliminazione di strutture contenenti ferro, riducendo il danno da radicali che avviene durante la reazione di fase acuta)

Ceruloplasmina àcattura del rame, con diminuzione della Reazione di Fenton e conseguente diminuizione della produzione di ROI e lipoperossidazione

Emopessina à legame e clearance dell'eme (e ferro in esso contenuto)

Aptoglobina à legame e clearance dell'emoglobina(con eme e ferro compresi), inibizione della produzione di ROI, stimolazione dell'angiogenesi

PROTEINA C REATTIVA

- E' tra le più analizzata in laboratorio, visto che è facilmente dosabile e che cambia anche di centinaia di volte la sua concentrazione, in maniera molto rapida (permette di seguire molto efficacemente l'andamento della flogosi)

- E' una pentrassina (pentamero, 5 unità)

- E’ sintetizzata dal fegato

- Deve il suo nome al fatto che si pensava legasse il polisaccaride C del Pneumococco; in realtà si è poi visto che il legame non è diretto, ma mediato dalla fosforilcolina. Da una parte lega quest’ultima, dall’altra lega la proteina C che si trova sui fagociti funzionando quindi come un osponizzante e agglutinante

- Attiva il complemento perché ha delle sequenze omologhe alla regione CH2 delle Ig

- Funziona come scavenger della cromatina liberata dalle cellule morte nei tessuti danneggiati

- Regola la trascrizione legando gli istoni e influenzando quindi il grado di compattamento della cromatina

- Modula la liberazione di citochine e linfochine (immunomodulatore)

- Diminuisce liberazione di superossido e l’adesione dei polimorfonulcleati

SIERO AMILOIDE A (SAA)

- E’ il precursore dell’amiloide A, responsabile dell’amiloidosi (PM 18 000 D; in realtà esistono diverse isoforme quindi il peso molecolare varia dai 9 000 ai 18 000 D)

- E’ sintetizzata dagli epatociti

- Circola nel sangue legata alle HDL

- Le funzioni sono poco note: sicuramene è chemiotattica sui linfociti e sui globuli bianchi
- Potrebbe essere implicata nell'Aterosclerosi in quanto aumenta l'ossidazione delle LDL
- Altre funzioni sono ancora in corso di studi

SCOPI DELLA REAZIONE DI FASE ACUTA

1. **Calo di ferro e zinco nel sangue** (nonostante causi rischio di anemie): questo perché sono co-fattori utili alla crescita dei microrganismi e di certe cellule tumorali. Il loro calo ne rallenterebbe la crescita.

1. **Catabolismo muscolare**: il muscolo si "sacrifica" per le mobilizzazione di amminoacidi richiesti per la proliferazione di linfociti, fibroblasti, per la sintesi di proteine di fase acuta, Ig, collagene per la riparazione dei tessuti. Una parte degli amminoacidi viene anche utilizzata per la gluconeogenesi che, insieme all'azione del glucagone e dell'insulina, aumentano il glucosio nel sangue e il suo uptake, in quanto rappresenta il principale metabolita energetico delle cellule.

1. **Azione sul SNC** (turbe del sonno, ipotensione): ulteriori sensazioni di malessere sono atte e diminuire l'attività fisica dell'individuo con risparmio delle energie a favore delle difese

ESEMPIO: il problema essenziale dell'animale libero è la ricerca del cibo. Nel caso in cui adempia a tale bisogno in condizioni debilitanti, potrebbe diventare a sua volta preda di altri cacciatori. Quindi la sensazione generale di malessere è volta al risparmio delle energie e delle condizioni di pericolo.

1. **Neutrofilia, chemiotassi, attivazione di leucociti**: aumento delle difese per aumentata fagocitosi ed esocitosi

1. **Attivazione dei linfociti**: risposta immunitaria

1. **Febbre**: aumento dell'efficienza della risposta immunitaria (effetto diretto), aumentata azione delle citochine sulle cellule (esempio: IL-17 necessaria per la chemiotassi dei neutrofili) , diminuita proliferazione di virus, batteri e do certi tumori (esempio: ad elevate temperature c'è aumentata richiesta di ferro per la proliferazione, ma la sua disponibilità è già diminuita da proteine trasportatrici)

DOMANDA: Perché tentiamo di ridurre la febbre se è un fenomeno difensivo?

Perché la febbre da ulteriore malessere al paziente, contribuisce alla cefalea, e quindi dovendo pensare al benessere del paziente, contrastiamo un meccanismo difensivo, somministrando farmaci che sostituiscano gli eventi difensivi naturali da noi bloccati. Allo stesso modo blocchiamo l'infiammazione nonostante sia una risposta difensiva per il fatto che spesso l'infiammazione ha pensanti effetti dannosi.

1. **Proteine della fase acuta**: opsonizzazione (come la proteina C reattiva, con facilitazione della fagocitosi), detossificazione (eliminano tossine), immunomodulazione (regolazione dei leucociti), attività antiproteasica (inibizione di proteasi liberate dai leucociti stessi, prevenendo danno ai tessuti propri), riparazione tissutale (fibrinogeno, una delle proteine più comunemente dosate)

RISOLUZIONE DELLA REAZIONE DI FASE ACUTA

Tali proteine circolano nel sangue e raggiungono tutti i distretti dell'organismo, determinando effetti a livelli sistemico. Le loro concentrazioni seguono l'andamento dello stato infiammatorio, quindi alla spegnimento dell'infezione le loro concentrazioni dovranno tornare a concentrazioni omeostatiche. La risoluzione della reazione di fase acuta è data dal **venir meno dello stimolo citochinico alla base**, quindi IL-1, IL-6 e TNF; avviene in maniera relativamente rapida perché le citochine implicate(e i loro mRNA) hanno **breve emivita**, quindi quando viene a meno lo stimolo che ne induce la produzione, rimangono solo quelle in circolo, che però vengono rapidamente eliminate. Questa è la difficoltà di utilizzare le citochine come farmaci; in questo caso il nostro obiettivo è invece quello di prolungarne l'emivita.

Sono presenti poi dei fattori inibitori:

- **GLUCOCORTICOIDI**: l'ACTH stimola la produzione da parte del surrene di cortisolo; questo non è altro che il cortisone naturale (il più potente antinfiammatorio). Ha la funzione di contenere la risposta di fase acuta e l'infiammazione sistemica, e interviene nelle fasi terminali portando a risoluzione dell'infiammazione. Agisce inibendo la sintesi di citochine infiammatorie in macrofagi e cellule stromali, e aumentando la sintesi epatiche.

- **IL-1Ra**: aumenta la sua sintesi e blocca il legame dell'IL-1 al suo recettore funzionale

- **sTNF-R**: blocca in soluzione il TNF contrastandone l'azione

- Differenziazione in senso **Th2** con produzione di **IL-4** con funzione antinfiammatoria in quanto inibisce la sintesi ci citochine pro-infiammatoria (IL-1, IL-8, PGE2, anione superossido in monociti/macrofagi), aumenta la sintesi di IL-1Ra, aumenta l'apoptosi di monociti

- **IL-10**: inibisce la sintesi di citochine pro-infiammatorie (IL-1, IL-6, IL-8, TNF) nei monociti/macrofagi, aumenta la produzione di IL-1Ra

Quindi come nella flogosi, anche la reazione di fase acuta viene terminata dalla sintesi di citochine anti-infiammatorie; conoscendo la formula leucocitaria e le concentrazioni delle varie proteine, il medico può farsi un'idea dell'andamento della malattia.

DOMANDA: Nel caso di danno epatico, sono prodotte lo stesso le proteine?

Data l'enorme potenzialità di ripresa e di aumento dell'attività del fegato, perché non vengano più prodotte deve esserci un danno molto cospicuo, come nel caso della cirrosi. Ma in ogni caso, a questo livello il problema non è più la mancata produzione di tali proteine ma il venir meno delle sue funzioni fisiologiche:

-Detossificare dall'ammonio à iper ammoniemia e tendenza al coma epatico

-Produzione albuminaà edemi e difficoltà nella deambulazione

-Produzione della bile e digestione dei grassi à steatorrea, disturbi alimentari, dolori intestinali

-Sintesi lipoproteine à deficit metabolismo dei grassi

-Produzione di fattori della coagulazione à emorragie

DOMANDA: Se aumenta la ceruloplasmina che sequestra il rame, perché c'è un suo aumento sierico?

L'aumento di tali proteine determina un suo aumento in forma legata, con inibizione del rilascio a livello dei tessuti dove determinerebbe la realizzazione della reazione di Fenton con produzione di radicali liberi e danno ossidativo.

Lezione di Patologia generale e fisiopatologia clinica (sem2) del 29/4/2013 (1)

---

professore: M.A.Cassatella

sbobinatore: Gaetano Paolino

revisore: Elena Bortolazzi

(*a inizio registrazione la lezione è già iniziata da qualche minuto. Il professore riprende il discorso dell'ipotesi di Knudson sul* ***RETINOBLASTOMA****, puntualizzando come ne esistano due forme:* ***familiare*** *e* ***sporadica.*** *NDR*)

(*Il retinoblastoma* ***sporadico***) è un'eventualità rarissima, che però può succedere: più passa il tempo, più c'è la probabilità che questo (*l'insorgenza di mutazione in entrambi gli alleli del gene RB, NDR*)accada, e quindi si sviluppi il tumore.

(*riferimento a schema sulle slide*) Alla nascita, l'individuo ha gli alleli sani; poi insorge in un certo periodo della vita una mutazione somatica di Rb, a cui deve seguire una mutazione somatica nell'altro allele: questo causa lo sviluppo del retinoblastoma.

Questo, sempre secondo la sua ipotesi (*di Knudson, NDR*) non doveva essere il caso della **forma familiare**: egli aveva ipotizzato che il bambino, già alla nascita, presentasse un allele mutato

ereditario. Quindi, secondo le leggi delle probabilità delle mutazioni, la probabilità che anche l'altro allele venisse poi colpito dalla mutazione non fosse di 1 su 10^12 (*come per la forma sporadica, NDR*) bensì di 1 su un milione. Quindi, questo soggetto ha una probabilità un milione di volte più alta di sviluppare il tumore.

(*dice qualcos'altro ma la registrazione è disturbata, NDR*)

Quindi, ereditando un allele già alterato, quest'individuo è più predisposto a sviluppare una mutazione nell'altro allele. E infatti, la sua ipotesi fu poi dimostrata essere corretta.

(*slide con l'occhio*) Qui vedete che nel retinoblastoma ereditario si ha una **delezione** a questo livello (*slide*) del braccio lungo del cromosoma 13. Infatti nel caso degli **oncosoppressori**, visto che si parla di perdita di funzione correlata ad alterazioni geniche, è ovvio che nella gran parte dei casi si abbiano delezioni: perdita di geni o di gruppi di geni.

(*slide con ovulo e spermatozoo*) Questo schemino vi mostra cosa succede nella forma familiare: la cellula germinale di uno dei due genitori ha già un allele mutato, che viene ereditato dal figlio. Questo allele sarà ereditato dal figlio in tutte le sue cellule, col risultato che, alla nascita, esso ha già qualcosa di anormale. Questo, come vedremo, lo predispone a sviluppare un'alterazione di varia natura a carico dell'altro allele, il che favorisce lo sviluppo del retinoblastoma.

Si è dimostrato che questa alterazione a livello di un allele ereditato da un genitore favorisce, in qualche maniera, tutti i meccanismi qui elencati: non-disgiunzione, duplicazione, (*qualcos'altro di indecifrabile, NDR*). Meccanismi che favoriscono l'alterazione dell'altro allele, causando quella che in inglese viene chiamata “**LOSS OF HETEROZIGOSITY**”, ovvero “**perdita dell'eterozigosità**”.

L'individuo è come se nascesse eterozigote, e per sviluppare la malattia necessita dell'inattivazione, mutazione o delezione anche dell'altro allele. Questo meccanismo è fondamentale nell'insorgenza di questi tumori ereditari caratterizzati da perdita di funzione di un gene oncosoppressore.

Nella forma sporadica, le cellule somatiche (*probabilmente intendeva dire germinali, NDR*) di entrambi i genitori presentano entrambi gli alleli normali, e così anche il figlio. Poi, ad un certo punto, secondo le leggi della probabilità, si ha una mutazione, seguita altrettanto casualmente da una seconda mutazione, che determina in età avanzata la malattia.

(*il professore, riferendosi alla slide, ripete ancora una volta la differenza tra retinoblastoma ereditario e sporadico a livello genetico: tutte cose già dette, NDR*)

Un altro esempio è il **NEFROBLASTOMA**, un tumore ereditario maligno del rene formato da cellule molto indifferenziate. Anche detto "**tumore di Wilms**", esso può manifestarsi in forma **sporadica**, oppure, nell'ambito di diverse sindromi, in forma **familiare**.

Il concetto è lo stesso: si ha, nella forma ereditaria, la **perdita della eterozigosi**. Esattamente come nel retinoblastoma, nella forma **ereditaria** l'individuo nasce già con un allele mutato, e sviluppa il tumore in età molto precoce a seguito della perdita dell'eterozigosità; nella forma **sporadica** nasce sano.

Knudson aveva dunque ipotizzato la presenza di un gene che sarebbe poi stato definito "**gene oncosoppressore**".

DOMANDA STUDENTE:

Nella forma familiare il retinoblastoma è bilaterale?

RISPOSTA:

Può essere spesso bilaterale, o anche multifocale

STUDENTE:

Questo perchè è più probabile che avvenga la seconda mutazione?

CASSATELLA:

Certo, primo perchè c'è già una mutazione dall'inizio, secondo perchè questa stessa mutazione rende più probabile l'insorgenza di una seconda mutazione.

A questo punto sorge una domanda banale: come mai il retinoblastoma interessa proprio la retina, se la mutazione si trova in tutte le cellule? (aggiunge però che questi individui mostrano predisposizione anche nei confronti di tumori delle ossa, del polmone, melanomi). Il motivo non è chiaro: probabilmente, nella retina sussiste qualcosa che facilita in qualche modo l'insorgenza del tumore, rispetto ad altri tessuti che, pur con l'allele mutato, non sviluppano neoplasia.

(*il professore suggerisce di rispondere all'eventuale domanda d'esame "come si è arrivati alla scoperta dei geni oncosoppressori?" spiegando le osservazioni epidemiologiche e gli esperimenti condotti da Knudson in merito al retinoblastoma, NDR*).

Tutto questo ha portato all'identificazione del prodotto genico del locus RB, ovvero l'importantissima proteina RB di cui abbiamo già parlato.

PROTEINA RB

È una fosfoproteina nucleare che svolge un ruolo fondamentale nella progressione del ciclo cellulare.

PRB (P sta per “phosphorilated”)è espressa in ogni tipo cellulare, è può essere presente:

- in uno stato ATTIVO (IPOFOSFORILATO)
- in uno stato INATTIVO (IPERFOSFORILATO)

Questo è uno dei casi in cui l'aumento della fosforilazione ha il significato di “spegnere” l'attività di una determinata proteina.

Nella sua forma ATTIVA, RB frena il passaggio dalla fase G1 alla fase S del ciclo cellulare.

Quando le cellule sono stimolate a dividersi (da parte di fattori di crescita o altri fattori), si innesca una cascata di trasduzione che esita nella **sintesi/attivazione** di chinasi ciclina-dipendenti (**CDK**) responsabili della fosforilazione di RB. Il freno viene rimosso, e la cellula può superare il primo “punto di restrizione”, progredendo da G1 a S. Se questo non avviene, il ciclo cellulare risulta bloccato.

(*illustrando la slide*) Qui vediamo fattori di crescita che avviano cascate di trasduzione di varia natura a seconda del tipo di recettore (e in questa cascata ci possono essere proteine dotate di attività oncogenica), che convergono su chinasi ciclina-dipendenti che vanno a fosforilare ulteriormente la proteina RB (che diventa quindi iperfosforilata), provocando il passaggio da G1a S. Questa è la via **positiva.** Vedremo poi che esiste anche una serie di segnali **negativi**, che partono da ligandi extracellulari o altre vie di trasduzione per arrivare ad **inibire** le chinasi ciclina-dipendenti **CDK**.

PROTEINE VIRALI

Come già visto, alcune proteine virali possono bloccare l'attivazione di RB tramite interazione proteina-proteina: proteina E7 del papillomavirus; antigene T di SV40.

RB così bloccata non lega più il complesso di fattori di trascrizione (rendendoli inattivi). I fattori di trascrizione quindi non sono più inibiti e attivano una serie di geni fondamentali per la progressione del ciclo cellulare. Quindi è da ricordare l’azione delle proteine virali di virus a DNA come ulteriore meccanismo di inibizione della funzione della proteina RB. Si ha dunque perdita di funzione di RB, nonostante essa sia normalmente sintetizzata e presente all'interno della cellula.

FUNZIONE DI RB

Nello stato ipofosforilato, RB lega il fattore di trascrizione E2F (che, più precisamente, è un complesso di più fattori diversi), impedendone il legame con le sequenze bersaglio sul DNA. All'arrivo dell'apposito segnale, RB viene iperfosforilata e libera E2F, permettendone il legame alle sequenze target e la regolazione di tutta una serie di geni bersaglio.

In realtà, la faccenda è più complessa, in quanto RB, oltre a E2F, lega un complesso di proteine che comprende istone-deacetilasi, istone-metiltrasferasi e tutta una serie di enzimi che modificano la cromatina, rendendola inaccessibile dal punto di vista trascrizionale, e quindi inattiva.

All'arrivo del segnale attivante le CDK, che fosforilano RB, si ha il distacco di tutto questo complesso che rende la cromatina inattiva; si lega E2F (*credo intenda che si lega al DNA, NDR*); vengono reclutati altri enzimi (es. istone acetilasi) che modificano la cromatina favorendone la trascrizione.

L'iperfosforilazione di RB innesca, insomma, la trascrizione di tutta una serie di componenti fondamentali per l'avanzamento del ciclo cellulare.

(*illustrando la slide*) Ecco qua un riassunto che include globalmente una possibile via di trasduzione in cui sono implicati questi meccanismi: guardiamo le frecce verdi; un segnale esterno positivo (un fattore di crescita, o anche il legame a delle integrine) attiva una trasduzione del segnale che può modificare chinasi, fattori di trascrizione, Ras ecc. portando alla sintesi di **ciclina D**.

Questa lega **CDK4**, formando un complesso attivo che va ad iperfosforilare la proteina RB, liberando E2F e permettendo la trascrizione dei geni bersaglio di tale fattore.

All'interno di questa via positiva, vi sono vari meccanismi di regolazione negativa, che si collocano a vari livelli: soprattutto gli **inibitori delle CDK** possono fermare e inibire questa cascata che "muove" il ciclo cellulare. Si tratta di **p16, p27, p21** ed altri fattori di cui parleremo, che funzionano dunque come **oncosoppressori**.

All'interno della via di trasduzione che porta all'inattivazione di RB, vi sono molte proteine e geni che possono essere "colpiti" da alterazioni: delezioni o mutazioni di p16, ad esempio, possono portare alla perdita di funzione di questo inibitore e quindi allo sviluppo di tumore. Quindi queste alterazioni riguardano oncosoppressori. Alternativamente, si può verificare amplificazione genica a carico della ciclina D o delle CDK; oppure ancora mutazioni o delezioni a carico della proteina RB.

RB fa molte cose: è coinvolta direttamente o indirettamente in una serie di processi: regolazione dell'apoptosi, replicazione e riparazione del DNA, nel controllo dei check-point del ciclo cellulare, in processi di differenziazione.

(*slide*) Qua vedete una tabella che elenca una serie di tumori umani accomunati dalla presenza di meccanismi che portano all'inattivazione della funzione di RB.

Sono meccanismi sia di tipo genetico che epigenetico; un esempio di alterazione **epigenetica** è la metilazione a livello del promotore, che reprime la trascrizione del gene. Questo tipo di mutazioni sono di più difficile identificazione rispetto a quelle di cui abbiamo parlato prima.

Insomma, vedete che in una serie di tumori è colpita, con percentuale variabile (20, 30, 50% a seconda del tipo di tumore), la proteina RB.

Nella maggior parte dei casi, durante il processo di progressione maligna del tumore prima o poi RB viene coinvolta. Questo è molto comune, ed avviene soprattutto nelle fasi più avanzate della storia del tumore.

(suggerisce di guardare con calma la tabella).

Negli ultimi anni sono state scoperte varie proteine dotate di una certa **omologia con RB**: trattasi di **p107** e **p130**.

Svolgono una funzione molto simile ad RB, nonostante se ne sappia molto di meno: anch'esse possono regolare il ciclo, possono essere sequestrate da proteine virali ecc.

Sono definite "**pocket proteins**", in quanto formano una sorta di "tasca" in cui sono sequestrati fattori di trascrizione o altre proteine.

La presenza di questa famiglia di proteine funzionalmente affini a RB spiegherebbe come mai in molti tipi cellulari si possa avere una "protezione" dalla perdita di RB: tutto ciò è avvalorato dall'osservazione che nelle cellule del retinoblastoma queste due proteine risultano assenti.

P53

(slide "guardiano")

P53 è un importantissimo oncosoppressore, definito il "**guardiano del genoma**".

(*legge una slide con un lungo elenco di tumori*): come vedete, in tutti questi tumori è riscontrabile una mutazione a carico di p53, gene fondamentale nel controllo della proliferazione cellulare.

Il gene è localizzato sul cromosoma 17, e rappresenta una delle sedi più frequenti di alterazione genetica nei tumori umani.

In qualsiasi tumore, durante la progressione, si ha prima o poi la perdita di funzione di questa proteina (*il prof insiste molto su questo punto, NDR*).

Nella maggior parte dei casi, le mutazioni inattivanti a carico di entrambi gli alleli del gene di p53 sono **ACQUISITE**.

Meno frequentemente, alcuni soggetti possono ereditare una copia mutata del gene p53: si tratta della gravissima sindrome di Li-Fraumeni, in cui c'è una produzione alterata della p53. I soggetti con questa sidrome sono predisposti a sviluppare tumori; tuttavia, a differenza del retinoblastoma, in cui la sede quasi esclusiva di sviluppo del tumore è la retina, in questi soggetti si hanno **uguali probabilità** di sviluppare **tumori "random"** in tutti i tessuti. Si possono pertanto avere anche tumori multipli: cervello, mammella, rene, ossa. Questo è un dato molto indicativo dell'importanza di p53.

p53 è definito "guardiano molecolare" in quanto impedisce la propagazione di cellule che hanno subìto un danno genetico.

In questa slide sono raffigurati numerosi possibili fattori responsabili di danno al DNA (radiazioni, raggi UV, sostanze chimiche ecc.). E' in questo caso che entra in gioco P53.

p53 è un **FATTORE DI TRASCRIZIONE** (*RICORDARE BENE, Cassatella sostiene che all'esame lo studente tende a non ricordare questa nozione, NDR*) con un'emivita molto breve, presente in condizioni fisiologiche a concentrazioni molto basse all'interno della cellula. Essa si trova legata ad un complesso proteico (comprendente, tra le altre, la proteina MDM2), da cui viene mantenuta a bassi livelli, poiché esso ne favorisce la degradazione da parte del proteasoma.

Un eventuale danno al DNA innesca un segnale che porta all'induzione, ma soprattutto alla stabilizzazione, di p53. Non è ancora molto chiaro quali siano i segnali che collegano tra loro questi eventi. La slide mostra comunque qualche esempio: una via che passa attraverso l'attivazione delle chinasi ATM e ATR.

Il punto fermo è che QUALSIASI DANNO AL DNA INNESCA UNA CASCATA DI TRASDUZIONE CHE ESITA NELL'ATTIVAZIONE DI p53.

Tra i vari effetti trascrizionali di p53 vi è l'induzione della trascrizione di MDM2, proteina di controllo che la sequestra, la esporta dal nucleo e ne favorisce la degradazione. Vi è quindi un meccanismo di feedback negativo.

Un danno al DNA può, ad esempio, attivare chinasi che fosforilano MDM2 e ne causano il distacco da p53; essa, attivata, si localizza nel nucleo, e controlla la trascrizione di diversi geni bersaglio: uno di questi codifica per p21 (detta anche CIP), un inibitore dei complessi CDK-cicline.

Si ha quindi il blocco della progressione del ciclo cellulare: è questa un'azione importantissima di p53.

Se il danno al DNA è di grossa entità, si ha invece l'attivazione di geni pro-apoptotici e la morte della cellula.

(*slide con le cellule a faccetta*).

Se c'è un danno al DNA, p53 all'inizio tenta di salvaguardare l'integrità del genoma: da una parte, come abbiamo visto, blocca il ciclo cellulare; dall'altra, attiva la trascrizione di geni codificanti per proteine riparatrici del DNA (ed esempio GADD45).

Se tutto va a buon fine e il danno viene riparato con successo, il ciclo cellulare viene lasciato procedere, e le cellule figlie non erediteranno l'alterazione genetica.

Se la cellula non è in grado di riparare il danno (qualora sia di grave entità), per evitare che il danno venga ereditato dalle cellule figlie, p53 induce l'espressione di geni pro-apoptotici (BAX, PUMA, NOXA ecc.) che mandano a morte la cellula.

Se p53 è alterata o deleta, tutti i geni da essa controllati non vengono trascritti: vengono meno tutte le reazioni da essa indotte in risposta a danno genomico, e questo può causare la trasformazione della cellula e la progressione maligna della progenie.

(*illustra una slide con vari meccanismi di attivazione di p53: erosione dei telomeri, rotture a doppio filamento del dna, vizi nella replicazione, alterazioni di oncogeni, disfunzioni dell'apparato mitotico, ipossia ecc*.).

A seconda del tipo di stress, p53 è in grado di controllare la situazione: o innescando una serie di meccanismi che portano a riparazione, o causando la morte cellulare per apoptosi.

(*slide*) Quest'altra figura vi mostra ulteriori meccanismi utilizzati da p53: essa causa l’attivazione di p21. Essa può inibire le CDK e anche PCNA, una proteina che in quasi tutte le cellule favorisce la replicazione, legandovisi direttamente. La p21 si lega fisicamente alla PCNA e questo è un altro meccanismo di inibizione della proliferazione. P53 poi attiva tutta una serie di geni che codificano per enzimi per la riparazione; può anche favorire la trascrizione di vari fattori pro-apoptotici (*slide*). Un altro importante ruolo di P53 è **l'inibizione dell'angiogenesi**, tramite l'induzione di questo importante gene: la **trombospondina**.

(*suggerisce di guardare con calma una slide che elenca numerosi geni attivati dalla p53).*

(*slide*) La p53 può fisiologicamente impedire tutti quei meccanismi responsabili dello sviluppo e della progressione di un tumore: all'inizio è importante per controllare eventuali danni al DNA, potrebbe essere responsabile dell'inizio della trasformazione, è importante nel controllare la proliferazione, nel sorvegliare il processo di replicazione, può inibire l'angiogenesi (elemento che favorisce la crescita del tumore), ha un ruolo nel controllare l'infiltrazione tissutale (e quindi le metastasi) delle cellule tumorali, ed influisce sui meccanismi di chemioresistenza.

Una perdita di funzione di P53 nell'arco di queste varie fasi della progressione maligna di un tumore si traduce in un'aumentata suscettibilità all'azione di mutageni e /o carcinogeni da parte della cellula; in una perdita della capacità di arrestare la replicazione, l'angiogenesi, la metastatizzazione e di indurre l'apoptosi.

Questa slide mostra il rapporto tra la fase di progressione di diverse neoplasie umane e la frequenza di riscontro di mutanti p53 nelle cellule neoplastiche o displastiche: **PIU' IL TUMORE VIENE ANALIZZATO IN FASI AVANZATE DI PROGRESSIONE (in fase di malignità avanzata), MAGGIORE E' LA PROBABILITA' DI RISCONTRARE ALTERAZIONI A CARICO DI p53**. Per esempio, nel caso del tumore dell'esofago, la metaplasia è una situazione in cui c'è solo una predisposizione allo sviluppo del tumore, rispetto all'adenocarcinoma, quindi la frequenza di mutazione è molto inferiore nel primo caso.

Nei tumori maligni è alta la probabilità di riscontrare mutazioni di p53, così come è alta la probabilità che a mutazioni di p53 possa far seguito progressione maligna.

In ogni caso DURANTE LA PROGRESSIONE MALIGNA PRIMA O POI SI PERDE LA FUNZIONE DI p53.

La p53 è anche il "guardiano della ploidia", ovvero del numero corretto dei cromosomi.

La p53 è stata cristallizzata, e se ne conoscono benissimo tutti i vari domini e regioni funzionali. Conosciamo anche i siti di legame per alcune proteine virali. Vi ricordo infatti che anche p53 può essere bloccata dall'azione di PROTEINE VIRALI, così come RB (*il prof suggerisce di ricordare bene questo meccanismo molecolare di inattivazione degli oncosoppressori, NDR*).

(*Slide "TUMOR VIRUSES*") Questa ve l'ho già messa la volta scorsa, e mostra virus che perturbano la P53, inibendola funzionalmente tramite la produzione di proteine specifiche. La p53 in questi casi è presente, ma viene inibita.

(*scorre velocemente le slide "punti cardine di mutazioni" e "cause di mutazione"*).

(*slide coi quadratini blu e rossi*) Un'altra caratteristica interessante di p53 è mostrata in questa figura: p53 è un oncosoppressore, però presenta delle proprietà che possono far sì che si comporti come oncogene.

Questo perchè la **forma attiva**, in grado di legare il DNA, è **tetramerica**.

Può succedere che avvenga una mutazione a livello di un allele; questa può comportare perdita di funzione del tetramero, ad esempio alterandone la conformazione. Quindi, si può avere perdita di funzione di p53 anche a seguito di una mutazione a carico di un solo allele. Se si ha un allele mutato, si possono avere 16 diverse combinazioni del tetramero p53. Di queste, solo una risulta essere funzionale: 15 volte su 16 si viene a formare un tetramero non funzionale.

E' quello che accade nella già citata sindrome di Li-Fraumeni: gli eterozigoti presentano una mutazione ereditaria di p53 sufficiente a causare un'alta predisposizione allo sviluppo di tumori.

Nel caso di p53, dunque, la legge della perdita di entrami gli alleli (*ovvero della "loss of heterozigosity, NDR*) può anche NON valere.

(il prof, richiamando una domanda fatta da qualcuno la lezione prima, fa un riferimento, di cui non capisco il senso, ad una slide; dopodichè rimarca il fatto che una mutazione monoallelica di p53 può essere sufficiente a indurre patologia tramite la formazione di tetrameri non funzionali, NDR).

(scorre velocemente una slide illustrante tentativi di terapia genica contro alterazioni di p53, e dice che si può lasciar perdere, NDR)

(slide "AT A GLANCE" che riassume quanto detto)

FAMIGLIA DI p53

Così come per RB, anche per p53 sono stati identificati vari membri di una presunta famiglia chiamata **famiglia di p53**; esso può essere considerato il capostipite di questa famiglia di proteine correlate, che comprende ad esempio p63 e p73, che hanno un'omologia abbastanza simile.

Di queste proteine si sa meno, però svolgono azione simile a p53. Se vi interessa, qua vedete una tabella con le principali caratteristiche.

(*mostra un'altra slide con molti tumori associati a mutazioni di p53: dice che dobbiamo impararla a memoria ma secondo me scherza; rimarca ulteriormente il fatto che p53 mutata è rinvenibile quasi sempre nelle fasi di progressione molto avanzate, NDR*)

ALTRI ONCOSOPPRESSORI

Sono molti; possono essere classificati come:

- Fattori extracellulari che legano recettori in grado di inibire la replicazione
- Recettori
- Trasduttori intracellulari
- Fattori di trascrizione
- Proteine intracellulari che regolano o inibiscono la progressione del ciclo cellulare
- Recettori "check point" (*non capisco bene cosa intenda, NDR*)
- Proteine che promuovono l'apoptosi

Vediamo qualche esempio:

TGF-beta

Fattore di crescita che, nello sviluppo di certi tumori, può fungere da oncosoppressore, attivando una cascata di trasduzione che blocca il ciclo cellulare.

Il suo recettore, che è dimerico, presenta, nella porzione citoplasmatica, un dominio Ser/Thr chinasico che fosforila una serie di fattori di trascrizione della famiglia SMAD.

Questo signalling porta, alla fine, alla trascrizione di inibitori del ciclo cellulare: p15 (inibitore del complesso ciclina D-CDK4/6) e p21 (quest'ultimo stimolato in modo relativamente più debole).

(*il prof descrive più dettagliatamente la via di segnalazione SMAD-dipendente di TGF-beta, leggendola da una slide, NDR*)

(*slide*) SMAD-3 Può anche complessarsi con E2F, facente parte di p107, che è un membro della famiglia di RB (*testuale; non molto chiaro, NDR*) e ne favorisce l'azione: mantenere inibito questo complesso trascrizionale che attiverebbe l'oncogene c-myc.

Sappiamo che in determinati tumori (soprattutto di pancreas, fegato, colon, ovaie e se ricordo bene anche del retto) vi possono essere alterazioni di geni che codificano per oncosoppressori localizzati a vari livelli della cascata del TGF-beta.

Ad esempio:

Loss of function del recettore: vi possono essere alterazioni, delezioni a livello del gene del recettore per TGF-beta, col risultato che esso non viene sintetizzato e quindi TGF-beta non può segnalare.

Loss of function delle SMAD: vi possono essere alterazioni che impediscono la sintesi di questi fattori di trascrizione, bloccando la via del TGF-beta.

Anche alcuni dei geni bersaglio di questa via possono essere importanti:

p15, che funziona come oncosoppressore;

PAI-1, attivatore dell'inibitore del plasminogeno, vale a dire inibitore di proteasi. A questo proposito, è utile ricordare che le cellule tumorali amplificano in maniera incontrollata la loro capacità di secernere proteasi ed enzimi litici, che digeriscono lo stroma circostante permettendo l'infiltrazione della cellula.

Durante la **metastasi** si ha dunque la **produzione massiva di proteasi**: TGF-beta induce la produzione di PAI-1, un inibitore che tampona l'azione di queste proteasi.

Un'inattivazione genica o funzionale di questa proteina quindi funziona come oncosoppressore (*testuale: secondo me si è confuso, e intendeva piuttosto dire che favorisce la progressione tumorale, NDR*).

(*riferimento a tabella*)

Vi sono anche altri oncosoppressori. Questa tabella elenca una serie di geni sulla base della classificazione che stiamo seguendo: geni localizzati sulla superficie cellulare, sulla faccia interna della membrana.

DOMANDA: nell'ambito della via di segnalazione di TGF-beta, SMAD-3 impedisce la trascrizione dei geni bersaglio nel momento di cui si complessa con E2F?

RISPOSTA: SMAD-3 fa parte del complesso p107, appartenente alla famiglia RB, che può legare E2F-4 o 5. E' solo uno dei molti complessi in grado di legare fattori di trascrizione responsabili dell'espressione di geni che permettono la progressione del ciclo cellulare. Nella fattispecie, p107 impedisce la trascrizione dell'oncogene MYC.

NF-1

È una GAP che attiva la funzione GTPasica di Ras. È dunque implicata in un sistema in cui si inseriscono proteine che, se alterate, funzionano come oncogeni, e proteine che, se mutate o perse, funzionano come oncosoppressori (*sic: non molto chiaro, NDR*)

WT-1

Gene soggetto a delezione nel **TUMORE DI WILMS** (**NEFROBLASTOMA**). Normalmente, codifica per un fattore inibente la trascrizione di IGF-2 (insulin-like growth factor 2) e del relativo recettore (IFG-2R).

Questo meccanismo blocca la proliferazione delle cellule renali durante lo sviluppo, e ne promuove la differenziazione.

Se il gene manca per mutazione o delezione, come capita in questo tumore ereditario, questo impedimento all'espressione di IGF-2 e IGF-2R viene meno: le cellule renali sono continuamente esposte al fattore di crescita, e proliferano incontrollatamente senza mai differenziare. Si sviluppa quindi il nefroblastoma, un tumore ad elevata malignità costituito da cellule molto immature che proliferano e non si differenziano.

APC – beta-CATENINA

Il **gene APC** è responsabile dello sviluppo della **POLIPOSI ADENOMATOSA FAMILIARE DEL COLON**, una patologia caratterizzata dall'insorgenza di numerosissimi **tumori benigni** della mucosa del colon. E' una patologia che predispone allo sviluppo di tumori maligni.

In questa patologia si ha mancata espressione di questo gene APC.

Esso è coinvolto nella cascata di trasduzione di **WNT**: normalmente, APC fa parte di un complesso proteico che lega la beta-CATENINA, impedendole di andare nel nucleo e attivare la trascrizione di alcuni geni bersaglio.

In assenza di segnale, quello che succede omeostaticamente è che questo complesso lega la beta-CATENINA, e ne favorisce la degradazione.

In presenza del segnale (ovvero del legame di WNT al suo recettore), si attiva una via di segnalazione che fa sì che la beta-CATENINA si stacchi dal complesso, vada nel nucleo, si leghi a PCF (*non sono sicuro, cfr. slide*) e promuova la proliferazione.

Questo, nella patologia in esame, accade dunque costitutivamente anche in assenza del ligando: la beta-CATENINA non è mai inibita.

(*slide con ghiandole intestinali*)

L'immagine a sinistra vi spiega cosa succede normalmente nel colon in presenza dell'APC; quella a destra invece illustra quel che succede se l'APC manca.

In fondo alle cripte vi sono le cellule staminali. A questo livello viene prodotto WNT: l'APC viene degradata, la beta-CATENINA si libera. Questo permette la proliferazione delle cellule staminali. Queste cellule, maturando, migrano poi verso il lume della cripta, e sono soggette ad un gradiente sempre minore di produzione di WNT. Esse, dunque, differenziano e smettono di proliferare.

Nel caso in cui l'APC manchi, le cellule migrano sempre verso il lume, e la beta-CATENINA è libera di funzionare anche in assenza di WNT.

Le cellule continuano a proliferare e differenziarsi in maniera molto alterata, e quindi si sviluppa il tumore.

DOMANDA: questi tumori si formano solo nel colon o anche nel tenue?

RISPOSTA: non lo so. Le cellule dei vari tessuti presentano meccanismi molto specifici; ogni tumore è una malattia a sé, diversa dallo stesso tumore di un altro paziente.

Lezione di Patologia generale e fisiopatologia clinica (sem2) del 30/4/2013 (1)

Lezione di Patologia generale del 30/03/2013

Prof. Cassatella

Sbobinatore: Pernigotto Michele

Revisore: Brunelli Anna

**Il professore conferma le lezioni del 2 e 9 maggio, e ha intenzione di recuperare il 16 maggio la lezione del 21.*

(Diapositive 1-2)

Lista abbastanza aggiornata di *tumor suppressor genes* con il nome dei geni, la localizzazione, la sindrome familiare, ovviamente questi stessi geni possono essere implicati nella forma sporadica dello stesso tumore e la funzione della proteina codificata dal gene.

(*il professore nomina, e in alcuni casi descrive brevemente, solo alcuni geni della tabella ndr*)

- RB: già spiegato nelle lezione precedenti, è implicato nel retinoblastoma, ma anche nell'osteosarcoma (tumore maligno delle ossa).

- TP53

- NF1: codifica per la proteina Ras-GAP.

- FHIT: gene oncosoppressore importante, implicato nei tumori polmonari.

- TGFBR2

- APC: spiegato nella lezione precedente, è implicato nella poliposi adenomatosa familiare, quindi tumori benigni che poi possono evolvere in tumori maligni; questo gene è anche implicato in altri tumori del retto nella forma sporadica.

- WT1

- VHL: gene interessante, determina la sindrome di von Hippel-Lindau e può generare anche un tumore maligno dei reni.

(Diapositive 3-4)

Il gene VHL codifica per la proteina VHL che regola la funzione del fattore di trascrizione HIF (*Hypoxia Inducible Factor*), il quale nella forma attiva lega la subunità β e attiva la trascrizione di moltissimi geni importanti tra cui VEGF, una citochina importante per indurre l'angiogenesi. HIF attiva anche la trascrizione di tanti altri geni implicati nella proliferazione, nella sopravvivenza, nel movimento…

Questo fattore HIF viene regolato dalla proteina VHL, codificata da un oncosoppressore:

- In condizioni di tensione di ossigeno normali: HIF viene idrossilato in prolina dall'enzima prolil-idrossilasi, questa modificazione permette il riconoscimento e il legame da parte di VHL e altre proteine, quindi si forma un complesso che favorisce la degradazione di HIF attraverso la via dei proteasomi.
- In condizioni di bassa tensione di ossigeno: c'è bisogno dell'attivazione di un certo numero di geni, quindi questa idrossilazione in prolina non avviene, HIF non viene degradato e può attivare la trascrizione.

Se manca VHL, il fattore di trascrizione HIF si accumula e attiva i suoi geni bersaglio senza regolazione.

HIF si lega anche ad altri complessi e produce una serie di alterazioni atte a contrastare la bassa tensione di ossigeno, compresa la trascrizione di geni come VEGF, EPO (produce l'eritropoietina che favorisce la produzione di globuli rossi).

I pazienti affetti dalla sindrome di von Hippel-Lindau sono a rischio di sviluppare tumori che colpiscono i reni ed emangiomi (tumori benigni dei vasi).

(Diapositiva 5-6-7)

Un'altra categoria di oncosoppressori sono gli inibitori dei fattori che controllano il ciclo cellulare, cioè gli inibitori delle CDK che permettono lo svolgimento del ciclo cellulare. Gli inibitori delle CDK vengono classificati in 2 famiglie, che hanno bersagli diversi:

- **famiglia CIP/KIP**: comprende p21, p27 e p57. Inibisce l'attivazione del complesso ciclina-CDK

- **famiglia INK4**: comprende p15, p16, p18 e p19. Lega le chinasi e impedisce alle cicline di legare le chinasi. Dato che il legame ciclina-chinasi è importante per l'attivazione della chinasi, in seguito all'inibizione di questa interazione la chinasi non si può attivare.

(*ndr: vedi diapositive 5, 6 e 7 per maggiori dettagli*)

(Diapositiva 8)

La tabella illustra le caratteristiche dei principali inibitori nucleari delle CDK, con i vari inibitori, la sigla, il locus, la proteina bersaglio e le principali proprietà.

Si riscontrano alterazioni che portano alla perdita della funzione di questi geni e quindi della proteina codificata.

(Diapositiva 9)

La slide illustra una lista di tumori umani in cui è possibile riscontrare perdita di funzione anche di membri della famiglia degli inibitori delle cicline (riquadro rosso) e in quale percentuale.

(Diapositiva 10)

La tabella mostra le alterazioni molecolari in tumori umani che portano a deregolazione dell'orologio del ciclo cellulare. Quindi il ciclo cellulare può essere colpito in più parti nei tumori e il risultato finale è la perdita del controllo del ciclo. Ciò può avvenire per:

- Alterazioni della proteina Rb: dovute a inattivazione del gene Rb, metilazione del promotore, sequestro della proteina da parte di fattori che ne impediscono l'attività.
- Alterazioni delle cicline: in questi casi c'è overespressione di queste proteine. Normalmente la loro espressione è finemente regolata (si chiamano cicline proprio perché vengono sintetizzate e immediatamente degradate, altrimenti si hanno problemi).
- Alterazioni delle chinasi ciclina-dipendente
- Alterazioni degli inibitori delle CDK
- *Multiple concomitant alterations by Myc, N-myc or L-myc*: sono alterazioni di fattori di trascrizione a loro volta attivati durante il ciclo cellulare.

(Diapositiva 11)

In tutti i tumori ad un certo punto durante la progressione ci sono delle alterazioni che vanno a colpire o le CDK o gli inibitori del sistema.

(Diapositiva 12)

Un’altra categoria di geni che vengono inclusi tra gli oncosoppressori sono i geni che codificano sistemi enzimatici deputati alla riparazione del DNA. Questi geni non contribuiscono direttamente alla proliferazione e alla crescita della cellula, ma riparano i danni che eventualmente la cellula subisce spontaneamente durante la divisione cellulare, oppure i danni che fanno seguito all’esposizione a sostanze mutagene di origine chimica o fisica (come le radiazioni). Se questa alterazione a livello del DNA non viene riparata e interessa un gene cruciale per il controllo della proliferazione e della differenziazione, allora ci sarà un problema, e questi sistemi intervengono in queste situazioni.

Questi geni vengono chiamati *caretaker* poiché codificano enzimi che si ‘prendono cura’ delle modificazioni geniche. Quindi se mancano non hanno un ruolo cruciale e diretto nella proliferazione e differenziazione, ma vengono persi i sistemi di controllo. In questo caso se viene alterato un gene cruciale per il controllo della proliferazione e differenziazione, questo non viene riparato, viene tramandato alle cellule figlie e collabora alla trasformazione neoplastica insieme ad altre alterazioni.

(Diapositive 13-14)

Il professore invita a ripassare da soli questi sistemi enzimatici di riparazione del DNA già studiati in biologia. Sono 6 diverse famiglie di enzimi.

(Diapositiva 15)

Questi geni sono quindi considerati oncosoppressori perché controllano la riparazione di un eventuale gene implicato nella proliferazione. Ci sono delle patologie ereditarie legate a un difetto del funzionamento di questi sistemi enzimatici: questi difetti possono causare direttamente dei tumori, oppure delle sindromi non tumorali (come l’anemia di Fanconi e la sindrome di Bloom) che predispongono allo sviluppo di tumori come conseguenza della mancata funzione legata ad alterazioni genetiche di questi sistemi enzimatici.

(Diapositiva 16)

Ci sono diverse modalità di predisposizione ereditaria allo sviluppo di tumori:

- **Sindromi neoplastiche ereditarie**: legate direttamente alla mancata funzione degli oncosoppressori.
- **Neoplasie familiari**: a eziologia e meccanismo ignoti. C’è un’evidente concentrazione di tumori in una famiglia, ma il ruolo della predisposizione ereditaria può in certi casi non essere chiaro.
- **Sindromi ereditarie autosomiche recessive caratterizzate da difetti di riparazione del DNA**: queste patologie aumentano la suscettibilità di sviluppare un tumore.

(Diapositiva 17)

Questa figura riassuntiva illustra la localizzazione di proteine localizzate nei vari compartimenti intracellulari e codificate da geniche possono fungere come oncogeni (in rosso) o come oncosoppressori (in blu). La beta-catenina è colorata in rosso perché è un fattore positivo di regolazione. (*ndr: il professore continua leggendo semplicemente le varie proteine*)

(Diapositive 18)

I meccanismi epigenetici rappresentano un altro meccanismo che porta alla perdita della funzione degli oncosoppressori; questi meccanismi intervengono per controllare positivamente o (in questo caso) negativamente la trascrizione di un gene e si riferiscono all'organizzazione della cromatina. Gli istoni possono essere modificati in fase post-traduzionale da parte degli enzimi acetilasi, deacetilasi, metilasi, demetilasi. In genere le metilazioni hanno un'azione repressoria sulla trascrizione del gene, anche se in realtà vi sono diversi tipi di metilazioni nei vari residui della proteina che hanno significato attivatorio.

(Diapositiva 19)

Nei tumori ci possono essere meccanismi epigenetici di ipermetilazione che vanno a colpire *tumor suppressor genes*: il risultato è il blocco della trascrizione del gene ipermetilato; quindi non ci sono mutazioni a livello del DNA, però la proteina non viene sintetizzata perché il promotore è bloccato. Questo complica molto spesso l'identificazione dei geni responsabili dello sviluppo diquel tumore.

N.B. tabella 7.2 della slide

(Diapositiva 22)

Sono disponibili dei farmaci attraverso i quali possiamo regolare l'espressione genica inibendo le deacetilasi e le metilasi. Sono farmaci comunque tossici, poiché non sono specifici.

(Diapositive 23-24)

Tornando ai meccanismi molecolari che causano l'attivazione di proto-oncogeni, questa tabella (se n'è già vista una simile) riguarda le traslocazioni cromosomiche.

Già alla fine dell'800 gli studiosi avevano notato che nelle cellule tumorali vi erano alterazioni cromosomiche, negli anni successivi ci sono state alcune scoperte che hanno rivelato l'importanza di queste alterazioni cromosomiche nei tumori. Oggi classifichiamo le alterazioni cromosomiche in primarie (non random) e secondarie (random).

I tumori si caratterizzano per la presenza di alterazioni cromosomiche di varia natura puntiformi che, a causa dell'instabilità genetica, continuano ad accumularsi man mano che il tumore progredisce e contribuiscono così all'acquisizione di un fenotipo sempre più maligno. Sorge

spontanea una domanda: ma allora queste alterazioni sono la causa o l'effetto? Sono valide entrambe le risposte, nel senso che possono esserci:

Aberrazioni primarie: possono essere determinanti per l'inizio o lo sviluppo del tumore, e come regola sono fortemente specifiche di quel tumore, cioè ci sono delle alterazioni cromosomiche che spiegano la patogenesi di quel tumore, l'inizio della trasformazione della cellula tumorale: coinvolgono oncogeni. Quindi tutti i tumori di quel tipo hanno quella specifica modificazione cromosomica.

Aberrazioni secondarie: avvengono dopo che il tumore si è sviluppato e sono importanti per la progressione. Sono determinate da instabilità genetica, una caratteristica intrinseca delle cellule tumorali che nel tempo continua a determinare nuove alterazioni genetiche e cromosomiche.

La diapositiva 25 illustra la nomenclatura dei cromosomi (es. p=braccio corto, q=braccio lungo, t=traslocazione)

(Diapositiva 26)

Queste alterazioni cromosomiche possono essere manifestazioni dell'instabilità genetica dei tumori. L'instabilità genetica può essere indicata da una varietà di caratteristiche cellulari sia a livello cromosomico sia a livello di DNA. A livello cromosomico il fatto che ci sia un'elevata percentuale di aneuploidia, delezioni, traslocazioni eccetera, sono evidenza di instabilità genomica. Essa si manifesta a livello di DNA come conseguenza di altri meccanismi (mutazioni, delezioni, inserzioni, difetti di riparazione, ricombinazione, amplificazione genica, instabilità dei microsatelliti).

A noi interessano quelle a livello cromosomico: aneuploidie (difetti del numero di un singolo cromosoma), traslocazioni, delezioni, inversioni, siti fragili (siti più predisposti alla rottura del cromosoma e quindi facilitano i vari scambi di pezzi di cromosoma), HSRs (*homogeneously stained regions*) e *double minute chromosomes* (queste ultime due hanno come conseguenza l'amplificazione).

(Diapositiva 27)

La figura illustra alcune di queste manifestazioni di instabilità: poliploidie (alterazioni del numero *n* dei cromosomi, quindi 23, 46, 92…), aneuploidie (alterazioni del numero di un singolo cromosoma, come nel caso delle trisomie…), traslocazioni reciproche, traslocazioni non reciproche, *double minutes*, HSRs e amplificazioni.

(Diapositive 28-32)

Nel corso degli anni sono state messe a punto una serie di tecniche per studiare queste alterazioni cromosomiche: all'inizio si utilizzava la tecnica del bandeggiamento, una colorazione specifica dei cromosomi basata sulla presenza di regioni più o meno colorate. Questa tecnica si è raffinata nel

tempo e ha permesso di distinguere all’inizio i vari cromosomi e quindi di notare eventuali anomalie di questi cromosomi: è stato possibile preparare il cariotipo, cioè la mappa cromosomica delle singole cellule, riuscendo a suddividere le varie coppie di cromosomi.

Questo ha permesso di preparare il cariotipo delle cellule tumorali, identificando così vari tipi di alterazioni nelle cellule tumorali (nelle figure si vedono il cariotipo di una cellula leucemica con traslocazione 4;11, di una cellula con HSR, di una cellula con traslocazioni cromosomiche e di una cellula con double minutes).

(Diapositive 33-35)

Qualche anno fa si è passati alla possibilità di colorare i singoli cromosomi con colori specifici mediante la tecnica FISH (*Fluorescent In Situ Hybridization*).

(Diapositive 36-37)

Oggi ci sono delle macchine che in poco tempo permettono di ottenere la mappa cromosomica, oppure determinare modificazioni epigenetiche di una cellula: queste tecniche si definiscono come NGS-based (*Next Generation Sequencing*). Le immagini fornite da questi macchinari sono note come *genomic landscapes*. *(es. diapositiva 38, paziente con carcinoma pancreatico).*

(Diapositiva 39)

Alcuni esempi di aneuploidie, quindi variazioni del numero di singoli cromosomi, o in meno o in più, con conseguenze diverse a seconda del gene colpito. È intuitivo che se c’è un cromosoma in meno e se quel cromosoma porta dei geni che codificano degli oncosoppressori, queste condizioni di monosomia favoriranno la perdita di funzione degli oncosoppressori; invece l’acquisizione di un numero superiore di singoli cromosomi (per esempio le trisomie) potrà spiegare la *gain of function* e quindi il meccanismo di attivazione di un oncogene.

(Diapositive 40-41)

Questa tabella abbastanza recente elenca delle modificazioni di singoli cromosomi che determinano o un guadagno o una perdita di funzione. Quindi conosciamo per ogni cromosoma le possibilità di alterazioni del numero nei diversi tumori che possono determinare attivazioni oncogeniche o perdita della funzione di oncosoppressori.

(Diapositive 42-46)

Le traslocazioni cromosomiche sono frequentemente presenti nei tumori e possono fungere da aberrazioni primarie, cioè possono avere un ruolo fondamentale nella patogenesi di quel

determinato tumore. Semplificando i concetti, queste traslocazioni cromosomiche possono provocare alterazioni **quantitative** (come nel linfoma di Burkitt) o **qualitative**.

Nel linfoma di Burkitt il gene traslocato va a giustapporsi a un gene che in quella specifica cellula è fortemente trascritto: accade quindi che questo gene passi sotto il controllo trascrizionale del promotore del gene che è molto trascritto e che esso stesso venga trascritto fortemente. In particolare nell'80-90% dei casi avviene una traslocazione 8-14: il gene myc (che si trova a livello del cromosoma 8) va a giustapporsi vicino al gene che codifica per le catene pesanti delle immunoglobuline (che si trova a livello del cromosoma 14); nel 10-15% dei casi può interessare il cromosoma 2 al posto del 14, o il cromosoma 22 al posto del 14, e in questi casi myc si giustappone vicino ai geni che codificano le catene leggere λ e κ. In ogni caso si ha l'aumento dell'espressione incontrollata del myc, che può essere normale o modificato a seconda del punto di rottura.

Questo aumento drammatico del myc nella cellula favorisce la formazione del complesso Myc/Max responsabile dell'attivazione di un certo numero di geni che aumentano la proliferazione della cellula.

Il myc può anche andare a disinibire Rb e questo favorisce la proliferazione.

Quindi il linfoma di Burkitt è un esempio di traslocazione cromosomica la cui conseguenza è un aumento della sintesi della proteina di un oncogene (aumento quantitativo del prodottogenico).

(Diapositiva 47)

Oltre al myc ci sono altri esempi di proteine (codificate da proto-oncogeni) che in seguito a traslocazioni cromosomiche aumentano in maniera drammatica e trasformano il proto-oncogene in oncogene. Per esempio nel linfoma follicolare a cellule B aumenta la sintesi dibcl-2, proteina che previene l'apoptosie chequindi contribuisce allo sviluppo di questo tumore.

La tabella elenca solo tumori ematologici perché è possibile ottenere più facilmente le cellule pure rispetto ai tumori solidi, in cui è più difficile isolare le cellule dallo stroma. Quindi tutti questi concetti derivano dallo studio di tumori ematologici.

(Diapositive 48-52)

Le traslocazioni cromosomiche possono determinare la formazione di proteine chimeriche di fusione; il cromosoma Philadelphia ne rappresenta l'esempio cruciale. Il cromosoma Philadelphia, che coinvolge i cromosomi 22 e 9, è stato la prima alterazione cromosomica patognomonica identificata;fu scoperto a Philadelphia da Peter Nowell, il quale studiando le leucemie mieloidi croniche (tumore maligno delle cellule mieloidi) ha notato che nel 90-95% dei casi c'era questa traslocazione 9-22. A livello del cromosoma 22è presente il gene BCR (*breakpoint cluster region*) e a livello del cromosoma 9 è presente il gene ABL (membro delle tirosinchinasi citoplasmatiche della famiglia del Src). Si forma così una proteina di fusione BCR-ABL 1 del peso di 210 kDa in cui la proteina ABL, in seguito alla traslocazione, perde le regioni di controllo negativo per cui rimane attiva in maniera incontrollata e costitutiva. Come conseguenza di questa alterazione molecolare si sviluppa la **leucemia mieloide cronica**, un tumore maligno delle cellule mieloidi, le quali dal punto di vista fenotipico si presentano come granulociti; quindi nel sangue di questi

soggetti si ha un enorme aumento di cellule mieloidi che hanno l'aspetto di granulociti neutrofili, basofili, eosinofili. Oggi si ritiene che all'inizio dello sviluppo di un tumore i primi insulti genetici (come la traslocazione cromosomica nel caso della LMC) avvengano a livello della cellula staminale ematopoietica, poi questa cellula modificata dal punto di vista genetico (a seconda del tumore, del tessuto, dei cofattori…) può rimanere indifferenziata o differenziare e fermarsi a vari livelli di differenziazione.

Anticipazione di alcune definizioni:

Leucemia: tumore maligno dei globuli bianchi come termine generale. Ci sono leucemie mieloidi (tumori maligni delle cellule mieloidi) e leucemie linfoidi (tumori maligni delle cellule linfoidi).

Le leucemie mieloidi e linfoidi a loro volta si possono dividere in acute e croniche in base al grado di differenziazione.

Leucemia acuta: si presenta con la faccia di cellule immature.

Leucemia cronica: la cellula si differenzia e si presenta con un fenotipo maturo.

Spesso le leucemie acute sono molto più pericolose, aggressive e hanno un decorso più veloce rispetto alle leucemie croniche, però i termini "acuta" e "cronica" non fanno riferimento al decorso clinico o alla prognosi, ma al grado di differenziazione.

I tumori possono essere più o meno differenziati: un tumore maligno si può presentare con un bassissimo grado di differenziazione (quindi indifferenziato), ma può anche manifestarsi con cellule molto differenziate, come nel caso della LMC. In genere un tumore molto indifferenziato è molto più aggressivo dal punto di vista clinico rispetto a un tumore differenziato, ma non sempre è così; ogni tumore ha una storia a sé.

Nel 10% circa dei casi di LMC non c'è la traslocazione cromosomica 9-22. Nel 90% circa dei casi di LMC avviene la traslocazione 9-22 che produce la proteina chimerica p210, ma si possono anche formare le isoforme p230 e p185. Se si forma la **p185** non si ha più la LMC, ma si ha una **leucemia linfatica acuta**; quindi la lesione si forma a livello della cellula staminale ematopoietica, ma a seconda del prodotto chimerico che si forma, la faccia del tumore cambia. Questo conferma l'ipotesi che la trasformazione non avvenga a livello delle cellule mature, ma avviene a monte.

(Diapositive 53-55)

Il signaling alterato da parte della proteina chimerica BCR-ABL1 va a toccare tantissime vie di trasduzione: NFkB, JAK2, STAT5, PI3K, Ras, XPB, RhoA, e quindi influisce sulla crescita, sulla motilità, sui difetti di riparazione, sulla produzione di radicali liberi…

Quindi l'aumento dell'attività di BCR- ABL 1 determina l'attivazione o l'inibizione di vie di trasduzione che comportano l'inibizione dell'attività di oncosoppressori, l'aumento della capacità di rinnovamento a livello della cellula staminale, l'aumento della capacità di proliferare e di sopravvivere,l'aumento dell'instabilità genomica e il blocco della differenziazione mieloide fino a un certo punto.

(Diapositive 56-62)

Lo studio del cromosoma Philadelphia ha anche portato allo sviluppo di una terapia specifica. L'industria farmaceutica ha creato un farmaco specifico (**Imatinib**) capace di inibire a basse concentrazioni l'attività chinasica di questa proteina chimerica che esiste solo nelle cellule tumorali. È stato il primo farmaco specifico contro un tumore, creato per bloccare il meccanismo responsabile dello sviluppo di quel tumore (a differenza degli inibitori generali della proliferazione cellulare che vanno anche a inibire la proliferazione delle cellule sane).

La tabella (diapositiva 58) fa vedere che nella fase cronica si ha una risposta ematologica (95%) e citogenetica (60%); quindi è un farmaco molto efficace che funziona in una percentuale elevata di pazienti.

Quindi lo studio dei meccanismi molecolari che stanno alla base dello sviluppo dei tumori, sta portando piano piano a capire quali sono i meccanismi e i geni coinvolti, in modo da sviluppare farmaci specifici che vanno a inibire esclusivamente il meccanismo sballato in quel tumore. Durante la terapia farmacologica accade spesso che le cellule tumorali comincino a rispondere a queste terapie specifiche innescando nuovi meccanismi di resistenza (e questo è un altro capitolo della problematica della cura dei tumori); anche nel caso del Gleevec (imatinib mesilato) all'inizio il farmaco funziona, poi viene dato a cicli e ad un certo punto non funziona più, e quindi si ha una ricaduta della patologia.

Sono stati sviluppati altri inibitori di tirosinchinasi di 1^, 2^ e 3^ generazione, che vengono somministrati secondo protocolli terapeutici.

Domanda: Dato che l'Imatinib inibisce il prodotto del gene chimerico e non agisce sull'alterazione cromosomica,la terapia deve essere cronica?

Risposta: Sì, la terapia è cronica e ciclica. Il farmaco inibisce la chinasi, quindi vengono inibite tutte le modificazioni a valle dell'attività alterata della chinasi, però la patologia non viene eradicata completamente (questo succede solo in certi casi): il farmaco prolunga la sopravvivenza e migliora la qualità della vita, poi ci sono anche nuovi farmaci che vengono somministrati secondo diversi protocolli, a diverse concentrazioni e in tempi diversi.

Quindi ci sono nuovi farmaci che possono bloccare a seconda della concentrazione non solo ABL ma anche altre chinasi, e quindi questi inibitori di chinasi sono utilizzati anche in altri tumori con successi diversi.

La diapositiva 62 illustra altri farmaci in grado di inibire selettivamente componenti delle vie di trasduzione importanti per la proliferazione, sopravvivenza, regolazione del ciclo.

(Diapositive 63-64)

Oltre a bcr-abl esistono altri esempi di prodotto chimerico che deriva dalla traslocazione cromosomica (la lista elenca soprattutto tumori maligni del sangue). Molto spesso si formano delle proteine di fusione che attivano in maniera incontrollata la trascrizione, i fenomeni epigenetici, le varie vie di trasduzione…

Quindi si va spesso a studiare il trascrittoma di queste cellule responsabile dell'azione di queste proteine di fusione.

(Diapositiva 65)

Questa tabella elenca in maniera più moderna le varie tipologie di alterazioni cromosomiche. Quindi vi sono proteine di fusione che possono originare da traslocazioni e riarrangiamenti cromosomici. N.B. tutta la tabella.

(Diapositive 66-71)

Questa tabella aggiornata elenca le anomalie cromosomiche selettive nei tumori maligni ematologici e nei tumori solidi.

NOMENCLATURA DEI TUMORI

(*ndr: le diapositive non sono ancora state caricate*)

I tumori hanno due componenti fondamentali: le cellule tumorali maligne e lo stroma, che supporta la crescita delle cellule tumorali ed è composto da elementi del tessuto sano, come il tessuto connettivo, i vasi e le cellule che infiltrano lo stroma.

Mentre fino a un po' di anni fa il tumore veniva visto solo come una massa di cellule trasformate proliferanti, oggi la visione è cambiata e si studia anche la componente stromale, che è molto importante per la sua influenza sullo sviluppo di un tumore.

Sulla base del rapporto tra massa di cellule che prolifera e stroma, possiamo individuare neoplasie midollari e neoplasie scirrose.

- Neoplasia midollare: tumore composto per la maggior parte da cellule tumorali che proliferano.

- Neoplasia scirrosa: tumore in cui la componente connettivale è prevalente rispetto alla componente neoplastica.

La classificazione dei tumori è comunque basata sulle caratteristiche del parenchima, cioè delle cellule che proliferano, quindi si parla di classificazione istogenetica.

Tumore e stroma intrattengono un cross-talk bidirezionale: la massa tumorale che cresce può influenzare l'attività dello stroma; lo stroma, influenzato da mediatori prodotti dal tumore, può influire sulla crescita tumorale.

I fibroblasti attivati possono in varie maniere favorire la crescita del tumore.

La vascolarizzazione, che condiziona l'aumento della massa tumorale, può essere influenzata da prodotti generati dal tumore stesso e generati dalle cellule dello stroma.

Importante è anche l'infiltrato infiammatorio che spesso è presente all'interno della massa tumorale.

Il tumore può liberare mediatori (fattori di crescita, proteasi, inibitori, molecole della matrice extracellulare, chemochine, citochine) che influenzano lo stroma, e lo stroma può produrre fattori di crescita attivi sul tumore, proteasi e inibitori di proteasi (per favorire o contrastare a seconda della situazione il movimento delle cellule tumorali), molecole della matrice extracellulare.

I macrofagi sono inizialmente reclutati grazie a chemochine e fattori di crescita: l'infiltrato infiammatorio può avere effetto positivo o negativo, può cercare di distruggere le cellule tumorali, oppure le cellule tumorali modificano l'ambiente in maniera tale che monociti si differenziano in macrofagi di tipo M2 fino ad assumere il fenotipo delle TAM (macrofagi associati al tumore), che favoriscono la crescita tumorale.

Lezione di Patologia generale e fisiopatologia clinica (sem2) del 2/5/2013 (1)

02-05-13

Lezione di Patologia generale

Prof. Claudio Sorio

Sbobinatore: **Anna Venturini**

Revisore: **Filippo Gibelli**

CICLO CELLULARE

E' un argomento importante per **capire le neoplasie**, poiché in quest'ultime spesso si riscontra un'**alterazione dei meccanismi che controllano il ciclo cellulare**.

E' in questo ambito che si sono identificati i **primi oncogeni e oncosoppressori**.

Esempio: retinoblastoma.

Partiamo da lontano: già alla **fine dell’800** l’italiano Bizzozzero propose una **classificazione** delle cellule e dei tessuti, che **tuttora valida**.

Era armato di un microscopio di quelli che c'erano a quel tempo che pure avevano delle **ottime qualità**, perché la capacità di risoluzione della microscopia ottica è **rimasta invariata** dalla fine dell’800 a ora; sono migliorate, invece, le **tecniche di rilevazione**, ma la tecnicamente la qualità era molto buona già allora.

In quel periodo si stavano sviluppando le tecniche di analisi dei tessuti, che si utilizzano ancora oggi nella **diagnostica istopatologica** per un primo livello di

analisi, soprattutto **in campo oncologico**.

Basandosi su questi studi, l’italiano Bizzozzero propose una classificazione delle cellule e dei tessuti, **tuttora valida**: è stata proposta una classificazione in **labili**, **stabili** e **perenni**. Qual era il criterio di classificazione?

Cellule e tessuti sono classificati **sulla base del numero di mitosi**.

Fate esercitazioni con il professor Dusi sui vetrini? Sicuramente se guardate bene **qualche mitosi la beccate**.

Le mitosi sono, infatti, **facilmente evidenziabili in un tessuto**: la cellula appare **dividersi in due cellule figlie** e i **cromosomi sono ben evidenti**

Secondo la classificazione di Bizzozzero, cellule e tessuti si dividono in:

- Labili: se il numero di mitosi è **superiore all'1,5%** ldelle cellule presenti nel campo microscopico

Sono tessuti con un **turnover veloce**.

Voi sapete che ci sono tessuti come il **midollo osseo**, come gli **organi linfoidi**, l'**epidermide**, e il **tubo gastroenterico** che hanno un turnover di circa una settimana; quindi

la superficie si rinnova in un tempo relativamente breve.

Ciò richiede una continua divisione cellulare.

- **Stabili**: se il numero di mitosi è **inferiore all'1,5%** delle cellule presenti nel campo microscopico. Cosa significa 1,5%? E' tanto o poco l'1,5% di mitosi? La mitosi è una **fase del ciclo cellulare abbastanza breve** (dura circa un'oretta) e l'intero ciclo cellulare **dura mediamente 24 ore**, quindi se noi andiamo a fotografare la fase mitotica significa che molte più cellule sono entrate nel ciclo cellulare; se noi andiamo a vedere l'ultima fase del ciclo e misuriamo l'1,5% in realtà misuriamo ciò che accade in un'ora su 24! Quindi **stiamo vedendo solo una piccola finestra di tempo!**

Ad esempio se vado acontare le auto in autostrada, da una fotografia aerea si possono contare le macchine che passano in quell'istante.

In un ora però **ne passeranno molte di più**.

Per questo motivo, quando in un tessuto si osserva l'1,5% di mitosi, si può pensare che **almeno il 30% delle cellule siano in ciclo** e prima o poi arriveranno alla mitosi.

Il 30% di cellule che si stanno rinnovando **non è poco**!

I tessuti stabili possiedono **cellule a vita lunga** e le **mitosi sono più rare**.

Questi tessuti sono in grado di proliferare come i tessuti labili, ma solo quando c'è una necessità, ad esempio tessuto epatico danneggiato, a seguito di una lesione, di un danno o di una rimozione chirurgica, viene ripristinato con un tessuto "sano". Ciò richiede l'**attivazione del ciclo cellulare**.

- **Perenni**: sono le cellule per le quali **non si identificano mitosi in corso**.

Esempi: **sistema nervoso e miocardio**

Non a caso questi sono i due organi che subiscono danni gravi, spesso permanenti e **difficili da trattare attualmente**; ciò proprio **a causa dell'incapacità di rigenerazione**.

Quindi un danno cerebrale è un danno che purtroppo attualmente **non è guaribile dal punto di vista della rimozione** di una lesione permanente a livello cerebrale: quando un neurone va in apoptosi o in necrosi purtroppo **non si sostituisce**… e qui si apre il grande scenario delle **cellule staminali**, della rigenerazione, eccetera, che è un capitolo molto affascinante ma che non affronteremo in questo corso.

Le cellule in grado di proliferare **non si ritrovano sparse nel tessuto**; esse sono situate in nicchie specifiche.

Ad esempio nel caso particolare delle cripte intestinali **la popolazione di cellule in attiva divisione è piccola**: essa si trova nella **zona più interna della cripta**.

Queste cellule provvedono a **rigenerare l'intero epitelio intestinale**, le cui cellule, una volta esaurito il loro compito, vanno in **apoptosi** e vengono **rilasciate** e quindi **sostituite**.

Nella condizione fisiologica perciò vi è una **specifica compartimentalizzazione delle cellule in divisione**.

Il ciclo cellulare è stato il **primo sistema di regolazione identificato**.

Questi studi sono stati effettuati dall'inglese Paul Nurse, che **vinse il Nobel** nel 1988 mi pare *(ndr: in realtà l'anno del Nobel è il 2001).*

Egli **studiò i lieviti**.

Da molti anni **si conoscevano le fasi del ciclo cellulare**, già dai tempi di Bizzozzero, ma non si aveva la più pallida idea **di cosa regolasse questo processo da un punto di vista biochimico, quindi molecolare**.

Conoscere i meccanismi di regolazione è fondamentale per capire eventuali alterazioni e intervenire dal punto di vista terapeutico.

Si possono fare, così, delle terapie palliative, di sostegno, ma se non si capisce la causa, si è allo stesso livello dei medici del '600-'700 e '800, che potevano solo descrivere la malattia e fare interventi che talora erano peggiori del male che dovevano curare.

Nel ciclo cellulare vi sono **varie fasi ben definite**:vi è una fase in cui la cellula aumenta di massa **fino quasi a raddoppiare la sua massa** e la sua quantità di DNA aumenta solamente **in un determinato periodo**… Poi da qui sono nate le varie fasi del ciclo cellulare, come vedremo...

Nurse osservò che queste fasi **correlavano con specifiche fluttuazioni di molecole**: erano attività specifiche regolate in contemporanea con questi fenomeni facilmente osservabili.

Alcune definizioni:

- CICLO CELLULARE: **periodo che intercorre tra due divisioni mitotiche**.

- INTERFASE: **tempo che intercorre tra la fine di una mitosi e l'inizio di una successiva**

Un altro **concetto ovvio** ma che va sottolineato è che la cellula deve essere i**n grado di replicare la sua sequenza di DNA solo una volta**.

Questa sembra una cosa ovvia, ma implica un meccanismo di regolazione estremamente fine: vanno **replicate 3 miliardi di basi** circa senza errori e senza aggiunta/delezione di qualcuna… anche perchè non è che la replicazione avvenga **dall'inizio alla fine**, perché ciò richiederebbe **tempi non compatibili** con la sopravvivenza dalle cellula.

Infatti vi sono **vari punti di inizio replicazione**: la cellula deve sapere il giusto nucleotide in cui finisce il primo pezzo e il giusto nucleotide in cui inizia il secondo pezzo e poi fare una **copia perfetta del proprio genoma** e una volta iniziata la replicazione, non può fermarsi, non può dividersi prima, altrimenti succede un **disastro**.

La cellula inoltre non deve iniziare un nuovo ciclo re plicativo **se non vi è una massa sufficiente**.

Tutto ciò implica dei **punti di controllo**.

Vi sono perciò dei **sensori intracellulari** in grado di capire quando è il momento di passare da una fase all'altra del ciclo e quando, invece, bisogna fermarsi.

La cellula **ha perciò dei margini discrezionali**: deve arrivare in fondo, ma **non è detto che ci debba arrivare in fretta**. Cioè se io devo fare una maratona, non è detto che io debba farla in 2 ore e 5 minuti… posso farla anche in 5 ore… se voglio farla… non sono obbligato a farla nel tempo di un'atleta… l'importante è ottenere il risultato… voglio fare la maratona e impiegarci 5 ore? Va benne, ci impiegherò 5 ore però l'ho fatta...

Non importa il tempo che ci mette per superare eventuali difficoltà; ciò che conta è che **la cellula si replichi correttamente**.

Vari fattori possono **interferire in questi meccanismi di controllo**.

Un altro concetto emerso ormai da parecchi anni è che la **transizione tra uno stato e l'altro** del ciclo cellulare è dovuto principalmente, ma non esclusivamente, a **meccanismi di regolazione della fosforilazione**.

Voi sapete infatti che le proteine possono essere soggette a varie **modificazioni post-traduzionali**, anche molto pesanti: possono essere glicosilate, metilate, fosforilate, ecc.

La fosforilazione di vari residui (Ser, Thr o Tyr) è un meccanismo **molto importante di regolazione**: può accendere/spegnere numerosi meccanismi.

Ciò è **molto importante nella divisione cellulare**.

Nel corso del ciclo cellulare vi è una **fase in cui il nucleo si divide**.

Questa fase, insieme alla **successiva citodieresi**, permette alla cellula di **dividersi effettivamente in due parti**.

Per fare ciò il DNA deve essere **compattato nei cromosomi**.

CROMOSOMI = come sapete sono la **forma compatta della cromatina**

E' molto importante che la divisione sia **equazionale**: ciò permette di originare **due cellule figlie geneticamente identiche** alla cellula madre.

Durante interfase la cellula **può rispondere a degli stimoli rallentando specifiche fasi**, ma durante la fase di mitosi, invece, la cellula **non risponde a nessun genere di stimolo**: una volta entrata in mitosi **la cellula comuque si divide** (ad eccezione del caso in cui vi sia un danno che uccida direttamente la cellula).

Per questo motivo se avvengono degli **errori nella segregazione dei cromosomi**, questi **non possono essere corretti** e vengono portati nelle cellule figlie, non c'è niente da fare.

Se avvengono degli errori nella mitosi verrà generata una **cellula con dei difetti**.

Quest'ultima può sopravvivere o no **a seconda dell'entità del difetto**.

Il ciclo cellulare si divide in **5 fasi**:

- G0 = **FASE DI QUESCIENZA**

La cellula funziona **nelle sue attività "istituzionali"**, cioè la cellula può svolgere tutte le sue funzioni.

- G1= La cellula entra in questa fase **quando necessita di dividersi**.

Questa fase è reversibile, cioè la cellula può **entrare e uscire da questa fase**.

La cellula non è a tutti i costi obbligata a procedere in questa fase: se durante questa fase vengono a mancare le condizioni o non c'è più la necessità di dividersi

la cellula può **tornare in G0**;

Quando invece la situazione è favorevole alla divisione, succede un **qualcosa di irreversibile**, ossia l'entrata nella fase...

- S = FASE DI SINTESI DEL DNA

Una volta entrata in questa fase la cellula è **costretta a completare la divisione** o è **indotta a morire**.

E' una fase **irreversibile**.

In questa fase **viene sintetizzato il DNA**.

In questa fase si sintetizza il DNA: qui avviene il **raddoppiamento della quantità di DNA**, solo in questa fase…!

Finita questa fase, la cellula entra nella fase in cui la cellula deve diventare abbastanza grande da raddoppiare il suo volume iniziale, la fase...

- G2 = FASE DI PREPARAZIONE ALLA MITOSI

Durante questa fase la cellula cresce **fino a raddoppiare il suo volume iniziale**, affinché possa poi **dare origine a due cellule figlie identiche** alla cellula madre iniziale;

Di nuovo in questa fase ci sono dei punti di controllo, come vedremo, che decidono quando è tutto pronto per passare dalla S alla G2… da quando entrare dalla G2 alla S, ecc.

- M = MITOSI

Si suddivide a sua volta in varie sottofasi: **profase, metafase, anafase e telofase**.

Solo nella **telofase** e nella successiva citodieresi la cellula viene **effettivamente divisa**.

Vediamo un attimo i tempi...

Fase G1 = può durare **da ore a giorni**. La durata di questa fase è **molto flessibile**.

Fasi S e G2 = fasi **relativamente costanti**, possono però essere **modificate**, soprattutto la fase S, in presenza di **eventuali agenti esterni**.

Ad esempio irradiando una cellula durante la sua fase S, tanto da danneggiare il suo DNA, essa **non prosegue il ciclo cellulare**, ma **attiva i meccanismi di riparazione** del

DNA, quindi la fase di sintesi viene **rallentata** per permettere la riparazione del danno.

In media il DNA si replica con una **velocità di 50 nucleotidi/secondo**.

Fase M = dura 1-2 ore. E' la fase più rigida: ormai il DNA è già stato duplicato, quindi non c'è bisogno di fare sintesi particolari.

In totale il ciclo cellulare dura pertanto **12-24 ore.**

Vi sono degli estremi: ad esempio le cellule che si dividono più rapidamente sono i **leucociti**, in particolare i **linfociti B**: essi se ben ricordo impiegano **7-8 ore per replicarsi**.

Questa immagine vi riassume le varie fasi: la **cromatina dispersa nell'interfase**, poi c'è la **condensazione della cromatina nei cromosomi**, l'**allineamento**, la **divisione equazionale** e la **riformazione di 2 nuclei**, della **membrana nucleare** e della cellula vera e propria.

L'attivazione e l'entrata nel ciclo cellulare dipendono dalla presenza di **segnali di regolazione esterni**, capaci di indurre la divisione cellulare.

Essi sono detti **FATTORI DI CRESCITA**. Cioè una cellula risponde a dei fattori di crescita, i quali inducono la divisione cellulare.

Come vi ho già deetto esistono dei **PUNTI DI RESTRIZIONE**: sono meccanismi molto complessi di **controllo tra un ciclo e l'altro**, che assicurano l'ordine degli eventi nel corso del ciclo cellulare: essi sono progettati in modo tale che **non ci sia una dipendenza diretta della via biochimica controllata**. Mi spiego meglio: se voi pensate alla biochimica classica, si ha che un enzima produce un substrato, il quale inibisce l'enzima stesso, affinché venga prodotta la giusta quantità di substrato: questa via biochimica è **direttamente connessa**, cioè **la via biochimica controlla se stessa**.

Questo NON AVVIENE nella divisione cellulare, perché è **molto più preciso e sicuro** un meccanismo che dipenda da altre vie biochimiche, **non correlate alla via biochimica che sta avanzando**…

Ad esempio ci sono dei sensori del danno cellulare che controllano la replicazione… perché **il danno cellulare è indipendente dalla quantità di DNA prodotto**. Faccio un esempio: se voi avete del DNA che replica, voi volete che replichi un DNA integro, non scassato, allora io devo avere un

sistema che mi controlli l'integrità del DNA e mi dica lui se va bene andare avanti, perché se si guardasse solo la quantità di DNA e non l'integrità **si rischierebbe di portare avanti del DNA "spazzatura"**.

Quindi se io facessi controllare la replicazione **solamente dalla quantità di DNA prodotto**, la cellula **non si fermerebbe mai**, andrebbe avanti fino in fondo… quindi devo avere un sistema indipendente che mi dica: "Ok, tu lo stai producendo il DNA, ma guarda che è scassato, non va mica bene, fermati!".

In questo senso i punti di restrizione sono **controllati in modo indipendente dalla via biochimica diretta**.

Non è semplice spiegare questo concetto, spero di essermi fatto capire.

Comunque i punti di restrizione sono **posizioni di controllo** che assicurano l'ordine di eventi nel corso del ciclo cellulare, e che quindi **integrano la riparazione del DNA con la progressione del ciclo**.

Le domande che questi sistemi "si pongono" *(ndr: il professore personifica questi sistemi e fa finta che si pongano delle domande)* sono ad esempio:

"Per passare dalla fase G1 alla fase S la cellula è **grande abbastanza**? L'ambiente è **favorevole**?"

"Per passare dalla fase S a G2: il DNA è **tutto replicato**? la cellula è **grande abbastanza**? L'ambiente è **favorevole**? Siamo sicuri che possiamo andare avanti?"

"Per passare dalla metafase alla anafase **i cromosomi sono tutti allineati** correttamente?"

Anche nella mitosi perciò, nonostante la rigidità dei tempi, **vi è un controllo per far partire al momento giusto le varie fasi**.

Tutte le fasi vanno avanti sotto il controllo di una certa regolazione… la differenza è che mentre nelle fasi precedenti è possibile allungare di molto la durata della fase stessa, **nella mitosi i meccanismi agiscono in tempi definiti**! Cioè entro 1-2 ore tutto accade… non possiamo rallentarle… Una volta partita la divisione, **non si ferma più**...

Sono stati descritti vari meccanismi molecolari che **controllano queste fasi**: si conoscono proteine che permettono di **entrare e controllare queste fasi**.

Se fate caso la **molecola p53** è **molto presente** nelle varie fasi del ciclo cellulare; essa è **uno dei più importanti oncosoppressori umani**.

Essa è **mutata in circa il 50% di tutti i tumori**, è' perciò un bersaglio **molto studiato dalle aziende farmaceutiche**.

Non voglio entrare nel dettaglio perché ci sono qui tutta una serie di molecole che descriveremo più avanti.

Per dividersi la cellula ha bisogno di **fattori di crescita**.

Essi si distinguono in:

- FATTORI DI COMPETENZA: **inducono l'entrata nella fase G1**.

Sono soprattutto fattori di crescita **polipeptidici**, che legano recettori siti sulla superficie delle cellule.

A seconda del suo **pattern di recettori**, la cellula potrà rispondere o meno alla presenza di questi ligandi.

Ad esempio: FGF, PGF, IGF (N.B.: GF = growth factor).

- FATTORI DI PROGRESSIONE: spesso agiscono in contemporanea ai fattori di competenza e permettono di entrare nella vera e propria fase S del ciclo cellulare.

Vi ricordo che quando siamo in G1, **si può anche uscire dalla G1**, quindi **non basta** avere un fattore di competenza, ma serve avere qualcos'altro.

Vi sono anche molecole che possono **antagonizzare l'effetto dei fattori di crescita**.

Ci sono perciò dei meccanismi di regolazione che controllano l'entrata nella fase G1 e nella fase S.

Entrando un po' più in dettaglio sui meccanismi molecolati, troviamo che vi sono anche **geni trascritti solo nelle fasi iniziali o più tardive del ciclo cellulare**.

Essi codificano per p**roteine che permettono l'effettiva sintesi del DNA** e la **divisione cellulare**.

Essi sono detti:

- GENI DELLA RISPOSTA PRECOCE

- GENI DELLA RISPOSTA TARDIVA

Tra questi vi sono importanti fattori di trascrizione, come ***Fos*** e ***Jun***, che sono "storici" nel campo della regolazione genica.

I livelli dell’ mRNA di questi due fattori di trascrizione **aumentano nei primissimi minuti** del ciclo cellulare, in seguito all’**induzione da parte di un fattore che induce la proliferazione**, come può essere l’aggiunta di siero a cellule private di siero per lungo tempo.

Questa tecnica è utilizzata per **sincronizzare le cellule**: negli esperimenti di questo tipo infatti **si tolgono tutti i fattori presenti nel siero** (perché il siero è pieno di fattori di crescita)… le cellule stanno un po' **a digiuno**, quindi le cellule non essendo più stimolate **vanno in fase G0**; dopo l’aggiunta di siero **quasi tutte le cellule entrano nel ciclo cellulare** all’incirca nello stesso momento.

Fos e Jun sono due dei vari fattori di trascrizione che **inducono la sintesi degli effettori**: le molecole della famiglia delle **CICLINE** (il nome non è stato dato a caso)… si tratta di **RNA messaggeri** che vengono attivati in fasi diverse del ciclo cellulare.

Come vedete la risposta di questi geni è legata alla **presenza/assenza dei fattori di crescita**: ciò correla con l’entrata della cellula nelle fasi del ciclo cellulare.

Ad esempio quando la cellula passa dalla fase G1 alla fase S i livelli del fattore di trascrizione ***Myc*** calano, poiché esso non è più necessario.

Contemporaneamente si alzano i livelli di altri fattori di trascrizione… è una sorta di ***"staffetta molecolare"*** finemente regolata.

E qui vediamo quali sono queste molecole che vengono attivate e con quali meccanismi… qui trovate diversi meccanismi in un'unica immagine, quindi vi chiedo un attimo di attenzione per seguirla…

I livelli di mRNA **corrispondono ai livelli della proteina** da lui codificata, poiché, appena essi arrivano nel citoplasma, vengono **quasi subito tradotti** (non è sempre così, ma in generale i livelli di mRNA **si possono prendere come livelli di proteina** da lui codificata, anche se ripeto che stiamo semplificando un po' le cose).

Una delle prime cicline a essere indotte è la **CICLINA D**: essa è prodotta nel passaggio da G1 a S.

Successivamente vengono indotte, nell’ordine:

- **CICLINA E** : prodotta nel **passaggio da G1 a S**, ma in una fase più avanzata rispetto la ciclina D

- **CICLINA A**: prodotta **alla fine della fase S fino all’inizio della fase G2**

- **CICLINA B**: prodotta nel **passaggio dalla fase G2 alla fase M**

In contemporanea vi sono delle proteine che **vengono degradate.**

Ad esempio questa ***p27*** è un **inibitore del ciclo cellulare** e vedete che viene ridotta, per cui **il freno viene tolto**… nonostante il livello del suo mRNA è costante, i livelli della proteina si riducono, poiché viene degradata.

Altre proteine variano dal punto di vista del loro **stato di fosforilazione**: non varia la quantità di mRNA o della proteina; ciò che cambia è lo **stato fosforilativo**.

Queste regolazioni sono **molto complesse**: cerchiamo un po' di sintetizzare alcuni concetti di base.

Poiché le cicline sono alcune tra le prime molecole che vengono indotte, cerchiamo di capire come funzionano...

Si è visto che esse **interagiscono con delle chinasi** dette ***CDK = cyclin-dependent kinase*** (vi dico che in italiano si dovrebbe dire **cinasi**, ma tutti ormai dicono chinasi… noi quando diciamo energia cinetica, non diciamo energia chinetica… mi da fastidio dire chinasi ma se dico cinasi mi ridono tutti dietro… la mia battaglia per l'italiano è persa in partenza… sui testi si legge anche **microfotografia**… ma cos'è una microfotografia? Una fotografia molto piccola! Ecco allora se è la fotografia di una cosa piccola dovrebbe chiamarsi ***fotomicrografia***… ed infatti su molti testi è scritto correttamente fotomicrografia… purtroppo però su altri c'è scritto erroneamente microfotografia… **sono piccole cose, ma anche l'utilizzo dei termini è importante**...)

Queste chinasi sono presenti ed attivate quando legano la ciclina, quindi **la ciclina è un modo per fare partire una attività enzimatica**.

Le cicline diverse hanno affinità diversa per diverse chinasi.

Alcune sono promiscue, ad esempio **CDK2 lega sia la ciclina E, che la ciclina A**, vi è perciò un certo interscambio

A loro volta i complessi enzimatici attivi ciclina-CDK possono essere regolati, inibiti, da vari **complessi di proteine dette INK4 o cip/kip**.

Esempi: **p16 è un importantissimo oncosoppressore**.

p21 è un oncosoppressore

p27 è un oncogene

p57 è spesso coinvolta nel cancro

Molte di queste molecole sono **coinvolte nelle neoplasie.**

Queste molecole possono **interagire e inibire il complesso attivo ciclina-CDK**.

Vi sono perciò **moltissimi meccanismi di controllo**:

- ciclina: deve essere presente per attivare le CDK

- cip/kip: possono inibire il complesso attivato

La ciclina, legando la CDK, **apre il sito catalitico di quest'ultima e gli permette di funzionare**.

Il legame della ciclina alla CDK però **è necessario, ma non sufficiente**, ad attivare l'attività enzimatica del complesso.

L'attività enzimatica del complesso, infatti, **dipende anche dallo stato di fosforilazione della chinasi CDK**, quindi questo è un ulteriore livello di regolazione!

Ad esempio: il complesso è attivo quando valgono le seguenti 3 condizioni:

- c'è **complesso ciclina-CDK**

- c'è **Thr161 fosforilata**

- **non sono fosforilate Tyr15 e Thr14**

Quindi capiamo bene che...

Le chinasi che fosforilano la Thr61 sono **attivatorie**; mentre chinasi che fosforilano Tyr15 o Thr14 sono **inibitorie**.

Le chinasi perciò sono attivatorie o inibitorie **a seconda degli amminoacidi che va a fosforilare**.

Lo stesso discorso può essere fatto per le **fosfatasi**: a seconda dei residui che va a fosforilare, la fosfatasi è **attivatoria o inibitoria**.

Si hanno perciò **funzioni diverse di enzimi della stessa famiglia**, a seconda di dove vanno ad agire.

Ma non è ancora tutto… perchè?

Perché il meccanismo può essere controllato anche con:

- **Degradazione ciclina**: il complesso non risulta più attivo

- Oppure con il **legame di un complesso di inibizione al complesso attivato**.

Perciò in ogni momento del ciclo cellulare vi sono **vari meccanismi che controllano e modulano l'attività**: questi assicurano una fine regolazione del ciclo cellulare.

Permettono,infatti, il ***"fine tuning"*** **del meccanismo di regolazione cellulare**, come il volume di una radio.

I meccanismi spiegati sono i più importanti, ma **non sono gli unici**.

Riguardano:

- f**osforilazione/de fosforilazione** con funzione attivatoria/inibitoria a seconda del contesto

- **degradazione o legame di specifici fattori** che controllano il ciclo cellulare

Sono tutti meccanismi di regolazione **reversibili e facilmente modificabili**.

I meccanismi generali sono questi… Poi in ogni tipo cellulare vi sono delle chinasi tessuto-specifiche, che regolano il ciclo cellulare.

Esempio: **CDK4 importante nelle cellule beta del pancreas**

CDK6 importante nelle cellule emopoietiche

CDK2 importante nelle cellule ? (*ndr la registrazione è poco chiara)*

Ci sono perciò chinasi **specifiche per alcuni tipi cellulari**… c'è perciò una **specializzazione del ciclo cellulare**.

Queste chinasi tessuto-specifiche si aggiungono alle chinasi che regolano il **CICLO CELULARE ESSENZIALE o CLASSICO**;

Sono le **chinasi più importanti**.

Queste chinasi si sono **conservate durante l'evoluzione**.

Esempio: **CDK1**

N.B. Quest'ultime chinasi sono quelle normalmente studiate e descritte. Lo studio del ciclo cellulare, infatti, **di solito viene fatto con 1-2 modelli cellulari**, non necessariamente rappresentativi di tutti i tipi cellulari presenti nell'organismo.

Nel corso dello sviluppo del cancro vi sono **moltissimi meccanismi che possono alterare il ciclo cellulare**.

Esempi:

- si possono attivare dei **sensori mitogenici in modo costitutivo e non controllato**

- possono **mancare dei freni alla divisione cellulare**

- mancano i s**egnali di stress cellulari necessari per inibire la proliferazione**: essi vengono perciò superati senza controllo.

- **instabilità genomica** … come vedremo il cariotipo delle cellule tumorali è **spesso alterato**

- **instabilità cromosomica**: ciò è un riflesso dell'instabilità genomica.

Qui si sintetizzano queste cicline e le CDK con gli inibitori (Cycline Dependent Inhibitor)… con la ***p16, la p15 e la p21***, che vanno a bloccare tutte queste cicline, quindi questa progressione delle varie fasi del ciclo cellulare sono **dipendenti dalla presenza di specifici complessi ciclina-CDK** che vengono a loro volta regolati con i meccanismi che vi ho citato e che **dovete imparare**…

L'attivazione del ciclo cellulare è indotta dall'attivazione di una serie di fattori di trascrizione: gli ***early response genes***.

Questi fattori di trascrizione sono **"intrappolati"** nella **PROTEINA DEL RETINOBLASTOMA**, che potremmo definire come una sorta di ***carta moschicida molecolare***.

Questa è stata uno dei primi oncosopressori identificati e si è capito come funziona: questa proteina è **inattivata dalla fosforilazione**: nella fase G0 la proteina del retinoblastoma è attiva; essa è perciò chiusa e in questo stato essa **intrappola dentro di se i fattori di trascrizione necessari per attivare i geni** bersaglio della divisione cellulare.

Quando la cellula decide di replicare questa proteina **viene fosforilata**.

Infatti uno dei primi bersagli del **complesso ciclica-CDK4**, che agisce all'inizio del ciclo cellulare, è il **gene del retinoblastoma**.

Appena si attiva CDK4 questa va a **fosforilare la proteina del retinoblastoma**, la quale si apre e rilascia i fattori di trascrizione della famiglia E2F.

Questi ultimi vanno a **legare i promotori dei loro geni bersaglio**, che codificano per le CDK e per le cicline successive.

Il prodotto del gene del retinoblastoma è perciò controllato dalla fosforilazione: ci sono perciò delle **chinasi che lo fosforilano** e delle **fosfatasi che lo defosforilano**.

Quindi se misuriamo l'attività del retinoblastoma tramite sicronizzazione delle cellule **visualizzeremo questa variazione di fosforilazione**, ma NON di quantità! La quantità invece rimane **più o meno costante**.

Un'altra proteina importante è **p53** di cui vi dico due paroline in più...

Risulta mutata in diversi residui in **moltissime neoplasie** tanto che si fa addirittura dell'**epidemiologia molecolare** basandosi su questa proteina: si sono infatti individuate **mutazioni specifiche** per determinati tipi cancerogeni.

E' una proteina **con attività trascrizionale**; essa infatti **può legare il DNA**. Ha una regione che **media la tetramerizzazione**; si possono perciò **formare complessi multipli**.

Agisce in varie fasi del ciclo cellulare: G1, S e G2. (**tutte eccetto la fase M**).

Il gene codificante p53 è stato **bersagliato dai tumori in modo massivo**: vi sono infatti tumori con più del 90% di cellule con la p53 mutata.

E' perciò u**no dei marcatori più sicuri della presenza di alterazione**.

Quando p53 salta, crolla tutto il meccanismo di controllo della qualità del DNA: ciò perché **p53 induce l'apoptosi delle cellule con un DNA molto alterato**.

La cellula tumorale ha sempre il **DNA molto danneggiato**: essa perciò deve **inibire la p53 sennò verrebbe indotta all'apoptosi**.

p53 perciò:

- **rallenta il ciclo cellulare con vari meccanismi**

- può **indurre l'apoptosi in certe condizioni**, eliminando così una cellula potenzialmente pericolosa.

SINTESI DELLA LEZIONE

Abbiamo analizzato come funziona il ciclo cellulare.

Vi sono le proteine **cicline** che legano le **CDK**, creando un complesso che **fosforila il prodotto del retinoblastoma**.

Quando il prodotto del retinoblastoma è fosforilato, esso **libera fattori di trascrizione della famigli E2F**.

Questi **legano il DNA** inducendo la **sintesi di geni collegati al ciclo cellulare**.

Si passa così dalla fase G1 alla fase S del ciclo cellulare.

Tutto ciò può essere controllato in più modi:

- Attraverso **inibitori del primo complesso**

- Attraverso **regolatori di complessi più tardivi nel ciclo cellulare**

Se vi è necessità di rallentare il ciclo si attiva ***p21***: essa è uno dei **bersagli trascrizionali di p53**.

Infatti quando p53 viene prodotta, essa **lega il promotore del gene p21 e lo induce**… per questo appena aumenta p53 aumenta anche p21 subito dopo.

p21 va poi a **inibire il ciclo cellulare**.

Infatti nelle cellule normali p53 non è espressa.

Essa viene sintetizzata nelle **cellule irradiate**, con conseguente **danno al DNA**. A ciò segue un **aumento di p21** con conseguente rallentamento del ciclo cellulare.

Se si aumentano le radiazioni la cellula va in apoptosi: ciò è controllato da p53.

Per questo p53 è un **bersaglio privilegiato nelle cellule tumorali**, dove il genoma è fortemente danneggiato.

Grazie a p53 vengono **eliminate un sacco di cellule danneggiate**.

Respirando si hanno danni ossidativi al genoma dell'ordine di **10000 lesioni ossidative al giorno per cellula**.

Questi danni dovuti alla semplice fosforilazione ossidativa, che porta alla **produzione di radicali liberi dell'ossigeno**, sono presenti normalmente.

L'invecchiamento non è altro che una **degradazione del genoma**.

Lo sviluppo di tumori è più probabile in età avanzata, piuttosto che in età giovanile e ciò perché **si accumulano lesioni**.

Una p53 funzionante **ci protegge da tutto ciò**, nonostante il genoma si degrada nel tempo.

I meccanismi di riparazione ci permettono di mantenere un genoma abbastanza integro nel tempo.

Spesso nei tumori viene **alterato il ciclo cellulare**.

Vari sono i bersagli, ma tutti sono coinvolti nel ciclo cellulare.

Esempi di bersagli iperespressi:

- Myc

- Fos

- Jun

- Recettori per i fattori di crescita

- Chinasi che iperattivano il ciclo cellulare

Esempi di Tumor Suppressor Genes:

- p53

- Rb

- Ink4a = inibitore di p16

- ATM = controlla la riparazione del DNA

- Altre molecole coinvolte nella riparazione del DNA

Nel gene codificante p53 vi sono **punti in cui si ritrovano molte mutazioni nei tumori**.

Vedete inoltre che vi sono inoltre siti in cui si legano **virus tumorali**: alcuni virus inducono tumori negli animali, poichè **producono proteine che vanno a mutare p53 o Rb**.

Lo studio di questi virus ha permesso di **scoprire i primi geni oncosoppressori e i primi oncogeni**, in particolare lo studio dei retrovirus.

Alcuni virus presentano nel loro genoma **copie attivate di oncogeni normali.**

Altri virus producono proteine che **legano e inattivano geni oncosoppressori**.

Ciò permetteva al virus di **indurre una replicazione incontrollata della cellula**, aumentando la sua capacità di produrre virioni.

Quali sono le mutazioni che troviamo nel ciclo cellulare che possano regolare appunto l'entrata nel ciclo cellulare?

Vedete che se noi partiamo dal mitogeno attiviamo tutta una serie di vie che portano a tutto quello che vi ho raccontato sulla ciclina, l'inibitore della ciclina, la fosforilazione di Retinoblastoma, ecc.

E qui vedete dove è possibile trovare alterazioni… Vedete ad esempio che la **perdita di un gene inibitore** si ritrova in:

- 80% dei tumori del pancreas

- 60% dei glioblastomi

- 60% del ? (*ndr dalla registrazione non si capisce*)

-75% delle leucemie acute

Vedete che **iperespressione di CDK4** (e perciò dell'attività del complesso CDK4-ciclinaD) si ritrova in:

- 50% (*dalla registrazione non si capisce)*

- 40% retinoblastoma

- 90% linfoma mantellare

Si nota che ogni tumore ha **caratteristiche diverse**; non hanno tutti la stessa identica via. Nonostante ciò **tutti alterano il ciclo cellulare**.

Vedete: perdita del retinoblastoma nell'80% del **carcinoma a piccole cellule del polmone**, mentre solo 20-30% in **quello NON a piccole cellule**, che però ha alterato questo *(ndr indica qualcosa sullo schermo)*, che è il 60%, quindi **comunque questa via è alterata**… se non è prima è dopo… E' come se io avessi una macchina: se mi si rompe una ruota o lo sfinterogeno o un pistone, o finisco la benzina, comunque la macchina è ferma.

Ad Esempio nel **carcinoma NON a piccole cellule del polmone** possono essere alterate:

- vie della proliferazione

- vie della riparazione del DNA

- vie del ciclo cellulare

- via dell'apoptosi (rilevante perché impedisce alle cellule di proliferare)

- via dell'invasione delle metastasi

I virus tumorali possono **bloccare la funzione di geni critici** (come p53 o Rb) **attraverso la produzione di prodotti virali**.

Sequestrando i fattori che controllano il ciclo cellulare o attivandoli in modo non adeguato questi virus **riescono a far proliferare di più la cellula**.

Esempio: mantengono aperto il prodotto del gene Rb facendogli rilasciare i fattori di trascrizione, i quali mantengono attivo il ciclo cellulare.

Nei tumori si osservano **gravi alterazioni del ciclo mitotico**.

Ciò porta ad **anomalie cromosomiche**.

Cariotipo umano normale: **46 chr; 2sessuali e 44somatici**.

Cariotipo cellula tumorale umana:

C'è un **numero di cromosomi diversi** e i cromosomi generati dalla **fusione di frammenti di cromosomi** diversi, mediante traslocazioni cromosomiche.

Ciò cambia radicalmente il contesto regolatorio dei vari geni: in base a dove sono posti i geni possono essere **più o meno espressi**, **funzionare o non funzionare**, essere **iperattivi o disattivati**…

Il genoma della cellula tumorale è perciò **molto alterato**.

Dato ciò è impensabile curare un tumore riportando le cellule alterate alla condizione normale di partenza; **si può solo eliminare le cellule tumorali**.

Lezione di Patologia generale e fisiopatologia clinica (sem2) del 6/5/2013 (1)

Lezione di patologia generale del 6/5/13

Professore Cassatella

Sbobinatore Enrico Prior

Revisore Lucrezia Caoduro

Continua **NOMENCLATURA DEI TUMORI**

-

Slide 6

Classificazione istogenica

[Mancano i primissimi minuti di lezione, la registrazione audio inizia a metà della descrizione della slide, ndr.]

I tumori che originano dall'epitelio squamoso **nella gran parte dei casi** avranno un aspetto simile all'epitelio squamoso.

I tumori che originano dall'epitelio ghiandolare, per esempio del tratto gastrointestinale, **in genere** avranno un aspetto simil-ghiandolare.

Questo ci permette di conoscere l'origine di un determinato tumore.

Slide 7

Poi i tumori si possono dividere in tumori benigni e maligni.

Come regola generale, anche se ci sono molte eccezioni, i nomi dei tumori benigni finiscono con il **suffisso –oma.** Per esempio tumori mesenchimali, ovvero provenienti dal tessuto mesodermico, come i lipomi, i fibromi, angiomi, osteomi. La nomenclatura dei tumori epiteliali benigni è un po' più complessa e si basa sia sull'istogenesi sia sull'architettura. Sulla slide ci sono alcuni esempi:

- l’adenoma, tumore benigno delle ghiandole o che comunque assume aspetto ghiandolare;
- il cistoadenoma, una variante del precedente, è un adenoma che produce delle grosse cisti.

Poi tumori epiteliali benigni come i papillomi e i polipi:

- i papillomi si caratterizzano per formare delle proiezioni digitiformi, sono tumori impiantati;
- il polipo, che è sempre un tumore epiteliale benigno, ha un peduncolo e si aggetta nel lume di un organo cavo come lo stomaco o il colon. Si vede nell’illustrazione un polipo sessile, è una massa ma *[a differenza del polipo peduncolato, ndr.]* senza il peduncolo.

Slide 8.

[Il professore legge la didascalia aggiungendo solo quanto riportato in seguito, ndr.]

a) è un polipo sessile, come quello visto precedentemente;

b) è adenomatoso, ovvero un polipo che presenta anche elementi ghiandolari;

c) polipo angiomatoso, è ricco di vasi all’interno;

d) papilloma, già descritto precedentemente;

e) adenoma cistico, è un tumore benigno delle ghiandole che presenta all’interno delle cisti

f) adenoma cistico papillifero, si forma all’interno una struttura cistica che ha le sembianze di un papilloma.

Nella parte sotto sono illustrati alcuni tumori maligni dell’epitelio, detti **carcinomi**, o anche epiteliomi.

g) Carcinoma papillare, molto simile ad un papilloma, ma ci sono alcune caratteristiche che lo contraddistinguono: una di esse, che si nota già dalla figura, sono le **cellule che infiltrano il tessuto sottostante**, mentre i tumori benigni, per definizione, non infiltrano, pur essendoci qualche eccezione. L’infiltrazione è il passaggio preliminare alla **metastasi.**

h) Carcinoma nodulare, con nodulo; anche qui si nota l’infiltrazione;

i) Carcinoma ulcerato;

l) Carcinoma cistico, che è il tumore maligno dell’epitelio ricco di cisti;.

m) Carcinoma multifocale: nella stessa area possono esserci più foci di carcinoma;

n) Carcinoma diffuso, un carcinoma che invade e infiltra il tessuto;

- o) Carcinoma stenosante, che si trova in un organo cavo, e produce tutta una serie di effetti che provocano restringimento dell’organo cavo.

In tutti questi casi, come già detto, si nota che cellule del carcinoma invadono il tessuto.

Slide 9

Tumori maligni

Spesso il tumore maligno è chiamato cancro e sono grossolanamente divisi in due categorie:

1. I Carcinomi
2. I Sarcomi, termine generale che indica tumori maligni che originano dai tessuti mesenchimali.

La nomenclatura degli specifici tipi di carcinomi o sarcomi è basata sul loro aspetto e soprattutto sulla loro presunta origine istogenica; si dice presunta perché non sempre è possibile riconoscere il tessuto di origine anche se oggi ci sono dei marcatori che aiutano ad identificare il tessuto di origine. I tumori maligni epiteliali che presentano un pattern simile alle ghiandole si definiscono **adenocarcinomi** (adenoma è invece il tumore ghiandolare benigno), mentre i sarcomi che originano o somigliano al tessuto muscolare liscio sono chiamati **leiomiosarcomi**.

Slide 10

Tessuti di origine del principali carcinomi

[Legge rapidamente la tabella, ovvero i tessuti di origine dei più comuni: adenocarcinomi (A), carcinomi a cellule squamose (B), o altri carcinomi (C). Aggiunge solo che i tumori del polmone a grandi cellule sono molto frequenti e che il tumore maligno del fegato, il carcinoma epatocellulare, può anche essere chiamato ***epatoma****, e questo è uno dei numerosi esempi di* <u>*eccezione alla regola di nomenclatura*</u> *vista prima. Ndr.]*

Slide 11

Alcuni **tumori connettivali** sia benigni che maligni

[Anche qui legge gli esempi, qui la nomenclatura segue la regola generale dei suffissi: -oma = benigno; -sarcoma = maligno; dice che questa tabella va assolutamente saputa bene! Ndr.]

Slide 12

Proprietà generali che caratterizzano i tumori maligni; qui ci sono concetti generali dei carcinomi rispetto ai sarcomi. *[Segue lettura della slide; fa notare che comunque non sono caratteristiche fisse, possono esserci eccezioni. Di seguito sono riportate le aggiunte rispetto a quanto scritto sulla slide. Ndr.]*

I carcinomi, dopo aver dato metastasi attraverso il circolo linfatico, spesso raggiungono il linfonodo drenante. Infatti spesso si ha il sospetto di carcinoma perché ci sono linfonodi anomali che ad

esempio si riescono a tastare, poi la diagnosi si fa con l'analisi del linfonodo. Invece i tessuti connettivali, essendo ben vascolarizzati, a differenza di quelli epiteliali, metastatizzano più facilmente attraverso il circolo ematico.

I carcinomi possono presentare una fase pre-maligna: questa è una fase in cui, durante lo sviluppo di un tumore, questo può avere determinate caratteristiche che ci dicono che è bene controllarlo perché potrebbe degenerare e diventare maligno. Torneremo comunque in seguito su questo concetto.

Slide 13 e 14

Classificazione in base al tessuto di origine, in cui si distinguono tumori costituiti da un solo tipo cellulare e tumori costituiti da più di un tipo cellulare.

[Lettura della tabella, con le seguenti aggiunte rispetto a quando riportato sulla slide. Dice che questa nomenclatura va saputa molto bene. Ndr.]

Emangioma ed angioma sono sinonimi.

Notare i **casi in cui non esiste controparte benigna**, ma c'è esclusivamente la possibilità che si formi il tumore maligno (sarcoma sinoviale, rarissimo; mesotelioma, in cui peraltro si nota la già citata eccezione nella nomenclatura; tumori delle cellule ematiche; tumori dell'epitelio testicolare; tumore di Wilms).

Di tumori maligni delle meningi c'è il meningioma invasivo ma anche il meningosarcoma.

Leucemie sono **tumori liquidi** che si manifestano con aumento drammatico del numero delle cellule del sangue; mentre i tumori, sempre delle cellule ematiche, ma localizzati sono i **linfomi**, che quindi sono **tumori solidi**.

Tumori maligni dell'epitelio possono essere chiamati anche **epiteliomi**.

Notare le varie eccezioni alla regola del suffisso –oma. *[Fra queste sottolinea in modo particolare il **melanoma** che è **maligno**, il corrispettivo benigno è nevo. Ndr.]*

Quelli delle ghiandolari salivari sono piuttosto rari.

Tumori che appaiono come costituiti da tipi cellulari diversi derivano da cellule totipotenti, ovvero cellule che hanno la possibilità di generare diversi foglietti. Sono i teratomi, benigni, e i teratocarcinomi, maligni.

Slide 15

Le **leucemie**, tumori **maligni** delle cellule del sangue, possono essere distinte in linfocitiche (o linfoidi o linfatiche) e mieloidi (o mielocitiche) ed in acute e croniche e quindi ci sono quattro classi.

Distinzione acuta/cronica è fatta in base allo stato della differenziazione della cellula neoplastica di origine: per le leucemie si pensa che questa cellula sia una cellula staminale che poi, a seconda dei casi, può differenziare fino ad un certo punto.

Poi ci sono anche, fra i tumore **maligni** delle cellule del sangue, il **mieloma multiplo** (o mieloma o plasmocitoma), costituito da cellule che "hanno la faccia di" *[espressione di Cassatella, più volte ripetuta, più avanti dice che è sinonimo di "avere il fenotipo di", ndr]* (ovvero possono funzionare anche da) plasmacellule. Quindi differenziano fino a plasmacellule e producono immunoglobuline monoclonali, ovvero di un solo tipo di immunoglobulina. Però poi ci sono anche mielomi multipli che non producono immunoglobuline, derivati da una cellula staminale la cui differenziazione ha fatto sì che tale cellula, pur avendo la faccia di una plasmacellula, non produca anticorpi.

Poi ci sono i **linfomi**, che si distinguono in Hodgkin's, che è una malattia particolare, mentre tutti gli altri sono i non Hodgkin's che a loro volta si suddividono in linfomi a cellule B, T e altre varianti. Il linfoma di Hodgkin è un tumore che si localizza negli organi linfoidi ed è ricchissimo di cellule, ma in realtà la vera cellula tumorale è una sola *[quella contrassegnata da una freccia nella slide successiva, mostrata a lezione ma che inspiegabilmente non c'è nel file che ha caricato sull'e-learning, ndr.]*, mentre le altre sono tutte cellule che infiltrano. È una malattia molto strana ricchissima di infiltrato infiammatorio.

Slide seguente *[anch'essa assente sul file caricato sull'e-learning; per chi ha le slide dell'anno scorso della Guttenberg è quella in basso a pagina 156. Ndr.]*

Immagine di come appaiono alcune leucemie:

- A sinistra vetrino leucemia linfatica acuta, si notano i blasti, linfoblasti, ovvero cellule molto grandi, con poco citoplasma e nucleo grandissimo.
- Al centro leucemia acuta mieloblastica, dove si trovano in circolo cellule immature di origine mieloide.
- A destra vetrino di leucemia mieloide cronica, dove in circolo ci sono cellule mieloidi molto più mature di quelle delle forme acute, infatti è possibile riconoscerle, hanno la faccia di granulociti, eosinofili e così via.

Slide 16 e 17. È una tabella abbastanza completa delle classificazioni viste fino ad adesso, da sapere bene. Nota tumore del fegato: benigno adenoma, maligno epatoma. Tumori di origine neuronale, ci sono tante cellule *[quindi tanti tumori, vedere slide, ndr.]*.

[Slide 18 su tumori tessuto nervoso, saltata perché, a suo dire, troppo specialistica, ndr.]

Slide 19

Classificazione comportamentale, basata sul comportamento dei tumori, li suddivide in benigni e maligni. Distinzione fra benigni e maligni basati sulla morfologia e soprattutto sul comportamento (decorso clinico). Si usano quattro criteri, importanti soprattutto gli ultimi due;

1. i livelli di differenziazione fino ad arrivare all'aplasia;
2. la velocità di crescita;
3. invasione locale;
4. metastasi, il vero criterio che discrimina i tumori benigni dai maligni, solo i maligni possono acquisire la capacità di dare la metastasi, mentre per definizione i tumori benigni non danno mai metastasi.

1. **1. DIFFERENZIAZIONE E ANAPLASIA**

Slide 20.

Il primo criterio è dunque la differenziazione, che è il grado grazie al quale le cellule tumorali assomigliano a quelle normali. Come concetto generale le cellule dei tumori benigni assomigliano molto di più, rispetto alle cellule dei tumori maligni, alle cellule normali del tessuto da cui originano. I tumori benigni in genere si mostrano molto più differenziati rispetto ai maligni, pur essendoci eccezioni. Ex adenoma tiroideo composto da acini tiroidei che assomigliano a quelli normali; oppure le cellule di un lipoma, tumore benigno del tessuto adiposo, assomigliano ad adipociti normali. Sebbene i tumori maligni siano in genere meno differenziati rispetto alla loro controparte benigna, in ogni caso quelli maligni possono mostrare un pattern molto variabile (grado di differenziazione molto variabile) che passa da tumore molto differenziato fino ad apparire come un tumore molto poco differenziato (quelli benigni invece appaiono spesso come ben differenziati). La mancanza di differenziazione si definisce **anaplasia**, che può essere una caratteristica, un hallmark, di una cellula tumorale maligna. Di una cellula poco differenziata può essere difficile individuare l'origine.

Slide 20-continua. Tramite i caratteri citologici indicati si può individuare una cellula anaplastica o poco differenziata:

- **Pleiomorfismo cellulare o nucleare**, ovvero variazioni della forma o delle dimensioni della cellula o del nucleo, maggiore è il pleiomorfismo minore sarà la differenziazione.
- **Ipercromatismo**, ovvero un'ipercolorabilità dei **nuclei** che frequentemente contengono nucleoli ben identificabili.

- **Rapporto nucleo-citoplasma**: nelle cellule tumorali **cresce a favore del nucleo** fino ad arrivare ad 1:1, mentre normalmente è 1:4-1:6 *[Cassatella inverte i valori, ma è chiaro, anche dalla slide, che si tratta di un refuso, ndr]*.
- Nelle cellule tumorali meno sono differenziate più è facile riconoscere **mitosi**, che possono riflettere un'intensa attività proliferativa; queste mitosi possono anche essere anormali.

Slide 21

[Professore legge la tabella, ndr]: questi parametri servono ad identificare il grado di differenziazione.

Slide 22

Il livello o grado di differenziazione si desume dall'analisi citologica, poi importante guardare la **struttura del tessuto**; molto spesso nel tessuto anaplastico può esserci disorganizzazione dell'architettura del tessuto: tumori maligni anaplastici sono completamente irriconoscibili dal punto di vista strutturale a differenza di quelli benigni che mantengono la struttura, i rapporti cellula-cellula e i rapporti con le cellule dello stroma.

Slide 23

Quindi il termine **anaplastico** si definisce sia una completa mancata differenziazione della cellula tumorale, sia si riferisce all'architettura dell'impalcatura del tumore che deriva da quel tessuto e che diventa dunque irriconoscibile.

Nell'immagine si vede a sinistra un rabdomiosarcoma, un tumore anaplastico del muscolo scheletrico, dove c'è un marcato pleiomorfismo sia cellulare sia nucleare, e ciò fa sì che sia praticamente impossibile riuscire a riconoscerlo come tessuto muscolare.

Slide 24

Grado

Come criterio di differenziazione si definisce il grado, che è il livello di differenziazione dei tumori.

[Il professore legge la slide, ndr]

Si dà allora un indice che va da 1 a 4. Il livello di differenziazione aiuta a prevedere l'aggressività di quel determinato tumore. In genere tumori benigni, ben differenziati, hanno un indice elevato e sono meno aggressivi (quindi con decorso clinico migliore) mentre quelli maligni, molto indifferenziati, hanno un indice più basso e sono più aggressivi (con decorso clinico spesso più infausto).

Slide 25

Illustrazioni: a sinistra mammella normale; al centro tumore benigno la cui struttura è abbastanza simile a quella del tessuto da cui deriva; a destra tumore maligno, con tutta una serie di alterazioni morfologiche e citologiche che permettono di definirlo come poco differenziato.

Quindi riassumendo: in genere i tumori benigni sono più differenziati di quelli maligni, i quali si presentano invece con gradi diversi di differenziazione, fino ad essere molto poco differenziati, indifferenziati (anaplastici).

Questa indifferenziazione delle cellule tumorali maligne è dovuta alla perdita dei parametri della differenziazione, ovvero la cellula torna indietro dalla differenziazione o invece deriva da un processo che provoca una mancata differenziazione, ovvero la cellula tumorale non differenzia?

Nessuno in realtà può essere sicuro della risposta, però attualmente si ritiene che sia la seconda ipotesi, ovvero che l'origine della cellula tumorale avvenga a livello di un precursore più o meno maturo e differenziato. A livello di questa cellula avvengono i processi trasformanti. Si veda ad esempio la **leucemia**, dove tale evento avviene quasi certamente nel precursore delle cellule mieloidi o linfoidi o in un precursore anche più indirizzato; ciò determina la perdita del controllo della proliferazione e la cellula può maturare fino ad un certo punto. Se si blocca **nelle prime fasi** della maturazione verso una determinata linea avremo una leucemia mieloide o linfoide **acuta**, mentre se la maturazione va avanti, la cellula tumorale avrà il fenotipo di una cellula mieloide o linfoide più matura. Poi chiaramente non è detto che queste cellule tumorali che hanno il fenotipo - ad esempio di un granulocita eosinofilo, neutrofilo, di un linfocita ecc.- si comportino come le cellule normali, avranno probabilmente anomalie nella funzione. Quindi pare che non ci sia un ritorno indietro nella differenziazione.

1. **2. VELOCITÀ DI CRESCITA**

Slide 26

Un altro parametro che distingue fra cellule benigne e maligne è la **velocità di crescita**; il concetto generale, pur con moltissime eccezioni, è che i tumori maligni crescano più velocemente di quelli maligni. Bisogna tuttavia ricordare che la velocità di crescita di un tumore è molto variabile.

Improvvisamente un tumore che cresce lentamente può iniziare a crescere velocemente, altri tumori invece possono espandersi velocemente fin dall'inizio. La crescita di un tumore maligno che deriva da un tessuto sensibile ad ormoni può essere condizionata, fino ad un certo punto, dai livelli di quel determinato ormone o ad eventi come gravidanza o menopausa. Poi velocità di crescita può anche essere influenzata dalla massa: se il tumore cresce velocemente la vascolarizzazione locale può non essere più sufficiente per portare nutrimenti, e quindi possono formarsi aree dove il tumore cresce più lentamente perché si verificano fenomeni di morte cellulare per ischemia.

1. **3. INVASIVITÀ LOCALE**

Slide 27

Solamente i tumori maligni sono in grado di invadere localmente, nella gran parte dei casi i tumori benigni nascono come una massa che si espande, per questo si parla di crescita espansiva dei tumori benigni. Spesso questi tumori benigni sviluppano una capsula di tessuto connettivo, dovuta alla risposta infiammatoria provocata dalla crescita espansiva del tumore. Questa struttura delimita il tumore e ne facilita anche la resezione chirurgica: rimossa la massa si può essere (quasi) sicuri di aver rimosso tutto il tumore. Tumori benigni non penetrano la capsula e nemmeno il tessuto normale circostante.

Invece i tumori maligni, a differenza di quelli benigni, sono invasivi: hanno la capacità di infiltrare e distruggere il tessuto circostante, ad opera di enzimi e meccanismi che vedremo più avanti. Non esiste capsula, delimitazione, per cui è difficile o impossibile l'enucleazione: nel caso si tenti di asportare il tumore si rimuove una massa in realtà molto più grossa, includendo anche un margine di tessuto sano di qualche centimetro intorno al tumore per avere maggiori possibilità di asportare tutto il tumore per evitare che esso recidivi.

Questo criterio è meglio dei due precedenti nel definire se un tumore è benigno o maligno, anche se il più importante è senza dubbio il quarto.

1. **4. METASTASI**

Slide 28

È una proprietà esclusiva dei tumori maligni, quelli benigni non danno metastasi. È quindi da solo un parametro sufficiente per distinguere fra tumori benigni e maligni.

[Slide 29 saltata, ndr.]

Slide 30

Riassume tutti i punti visti finora. *[Il professore legge tutta la tabella, facendo solo le seguenti aggiunte, ndr]*.

Gross sta per caratteristiche grossolane. Atipia è un marcatore della differenziazione

Slide 31.

Disegno con tumore benigno del tessuto fibroso dell'utero (leiomioma) e sua controparte maligna (leiomiosarcoma). *[Il professore legge poi le caratteristiche indicate sulla slide sotto i riquadri BENIGN e MALIGNANT, con la seguente aggiunta, ndr.]*.

La necrosi è dovuta al fatto che in alcune aree del tumore non riescono ad arrivare abbastanza sostanze nutritizie.

Slide 32.

Perché i tumori causano **sintomi clinici**?

[Cassatella legge i punti sulla slide, aggiungendo quanto segue, ndr.]

I primi cinque punti possono valere sia per i tumori benigni sia per quelli maligni. Per il primo caso ("pressione sugli organi circostanti") si pensi all'esempio del cervello, dove anche un tumore benigno può portare alla morte perché si espande in uno spazio non espandibile. Quindi anche i tumori benigni possono portare a gravi deficit funzionali, a seconda del tipo di tumore e alla localizzazione.

I punti "invasione locale" con distruzione del tessuto e "disseminazione a distanza" si riferiscono invece soltanto ai tumori maligni.

Le sostanze prodotte dal tumore possono essere appropriate ma prodotte in eccesso (come nel caso dei tumori che colpiscono le ghiandole) o inappropriate, a causa delle modificazioni genetiche. Queste fanno sì che la cellula tumorale acquisisca la capacità di produrre proteine o sostanze che la cellula d'origine normalmente non produce.

Slide 33.

Rapporti con l'ospite che possono causare conseguenze cliniche.

[Il professore legge la slide, aggiungendo quanto segue, ndr.]

Produzione di ormoni eccessiva genera sintomatologia da iperfunzione.

Slide 34

Un quadro clinico che si associa molto spesso ai tumori maligni, specie nelle fasi avanzate, è la **cachessia neoplastica**. Questa è una delle cause più importanti che possono portare a morte un paziente con un tumore maligno.

È una sindrome che rientra nelle ***wasting syndroms***, che comprendono:

Starvation (che si potrebbe tradurre come "affamamento", anche se non esiste traduzione precisa, è una condizione in cui l'individuo ha fame ma non può mangiare e quindi si deperisce). È una condizione reversibile, che si può curare; può essere dovuta ad un inadeguato apporto calorico.

Sarcopenia, che è una sindrome in cui si ha una riduzione della massa muscolare legata non ad una patologia specifica e non accompagnata da perdita di peso, è un processo fisiologico più o meno evidente a seconda dell'individuo.

Cachessia. Sindrome degenerativa irreversibile legata soprattutto alla presenza di tumori, mentre tanti anni fa si osservava anche in malattie infiammatorie o infezioni croniche molto gravi come la tubercolosi. Non è reversibile nemmeno se si somministra nutrimento nell'individuo; è una sindrome metabolica legata ad uno squilibrio nella produzione di alcuni fattori. Tra questi importantissimo è il TNF (Tumor Necrosis Factor), legato alla cachectina, perché negli animali induceva cachessia.

Slide 35

[Il professore legge la slide, con le seguenti aggiunte, ndr.]

Astenia è una sensazione di debolezza e stanchezza.

Ipoproteinemia è la diminuzione della concentrazione delle proteine nel sangue, la cui concentrazione normale è 7 grammi per decilitro (1dl=100 ml).

Si veda dalla tabella come la massa diminuisca drammaticamente (parametri indicati dalle frecce)

Slide 36

Patogenesi della cachessia, legata a tutta una serie di cause.

[Cassatella legge la slide aggiungendo quanto segue, ndr.]

a) Dirette (azione invasiva e distruttiva) o indirette (amiloidosi);

b) Legate alla funzione di mediatori, importante la diminuzione dell'albuminemia;

c) Anoressia;

Slide 37 sulle cause dell'anoressia *[Cassatella le legge velocemente e ci dice di guardarcele, sottolinea soprattutto il fatto che l'alterato metabolismo dei glucidi e dei lipidi porta ad aumento lattato e chetoni che favoriscono questa condizione.]*

d) Caduta difese immunitarie. (Slide 38)

Slide 39

Meccanismi molecolari, uno squilibrio metabolico porta ai punti indicati sulla slide *[che il professore legge velocemente, ndr.]*

Slide 40

Soprattutto il TNF è la citochina chiave di questa situazione anche se ultimamente ci si sta dando meno importanza. Man mano che si studiano i tumori con metodiche più affinate, si è notato che possono contribuire altre molecole (fra cui ad esempio è importante l'IL-6) mentre altre ancora, come il LMF (Lipid-Mobilizing Factor), non sono nemmeno ancora ben caratterizzate.

[Slide 41 saltata, ndr.]

Slide 42

Illustra possibili circuiti che possono spiegare i meccanismi generali della crescita dei tumori, la produzione di citochine che causano cachessia, azione sui muscoli e così via, si crea squilibrio che alla fine porta alla cachessia.

[Slide 43 saltata, ndr.]

Slide 44

Altre manifestazioni cliniche che possono manifestarsi nei tumori, specie quelli maligni, sono **le sindromi paraneoplasitche**, che sono molto importanti.

[Cassatella legge la definizione sulla slide, sottolineando che non sono dovuti ad una azione diretta del tumore che si espande, che cresce nel tessuto provocando danni, ma ad altri meccanismi che sono sempre dovuti al tumore. Sono molto comuni e possono essere la spia della presenza di un tumore da qualche parte che le ha causate.]

Si suddividono in sindromi paraneoplastiche **di tipo endocrino e non endocrino.**

Quelle di tipo endocrino sono delle sindromi che si manifestano clinicamente con la iperfunzione di ormoni. Sono dovute alla presenza di un tumore in un tessuto che normalmente non produce ormoni, ma le cellule tumorali producono ormoni (secrezione ormonale ectopica). Quindi tumori di tessuti epiteliali che non producono ormoni iniziano a produrre ormoni e causano la sindrome paraneoplastica endocrina.

Le sindromi paraneoplastiche non endocrine sono sempre legate alla presenza del tumore, ma per altri meccanismi, in genere legati alla produzione di sostante anomale o autoanticorpi.

Slide 45

Tabella su **sindromi paraneoplastiche endocrine**

Sono sindromi con manifestazioni tipiche che devono far sospettare la presenza di un tumore.

[Il professore legge i punti della slide con le seguenti aggiunte, ndr.]

Dal punto 4. si deve capire che il problema non era la ghiandola, ma che può esserci un tumore da qualche parte.

Slide 46

Alcuni sintomi clinici e meccanismi biochimici possono essere correlati all'azione incontrollata di determinati ormoni.

Esistono dei tumori, che originano da tessuti non correlati alle ghiandole che normalmente producono questi ormoni, che iniziano a produrre questi ormoni. Questo avviene a causa di mutazioni genetiche oppure di lesioni molecolari di vara natura. Ciò si definisce **metaplasia molecolare**: produzione di una sostanza che normalmente quel tessuto non produrrebbe.

Esempio: il mieloma multiplo che può produrre fattore che aumenta l'attività osteoclastica causando un aumento di Calcio nell'individuo, ipercalcemia, che porta ad alcuni fenomeni (costipazione, poliuria ecc.).

Slide 47

Oppure possiamo avere un paziente che si manifesta con sintomi clinici riconducibili a endocrinopatie, ad esempio la sindrome di Cushing o altre riportate nella tabella. Si analizzano le ghiandole di questo paziente e si nota che sono perfettamente normali, perché alla base di queste sindromi c'è il tumore, il vero responsabile della sindrome endocrina.

Slide 48

Tumori di tessuti che normalmente producono una sostanza, mentre il tumore ne produce un'altra, causando una sindrome endocrina.

[Si veda la slide per gli esempi, Cassatella legge quello delle cellule C parafollicolari e del Pancreas endocrino, ndr.]

Queste viste finora erano dunque sindromi paraneoplastiche endocrine, cioè le sindromi cliniche legate ad una produzione anomala di un ormone da parte di un tumore che origina da un tessuto che normalmente non produrrebbe quell'ormone. Ciò va sempre tenuto a mente nella diagnosi differenziale.

Slide 49, 50 e 51

Poi ci sono **le sindromi paraneoplastiche non endocrine**: si manifestano con quadri morbosi generali che possono essere dovuti a meccanismi noti ben specifici, come vasculopatie, emopatie (vedi tabella); la DIC è molto frequente. Questi quadri clinici possono essere dovuti alla presenza in qualche distretto di un tumore che produce delle sostanze oppure, spesso, induce la produzione di autoanticorpi che vanno a provocare danni sulle cellule normali e sono così responsabili di questa sindrome.

[Slide 52 solo mostrata ma non commentata, ndr.]

Lezione di Patologia generale e fisiopatologia clinica (sem2) del 7/5/2013 (1)

---

sbobina 7/05/2013

Le **sindromi paraneoplastiche** sono una potenziale manifestazione clinica con la quale un tumore si può presentare. Nell'ambito delle sindromi paraneoplastiche si descrivono una serie di sindromi e manifestazioni che possono essere la spia di un tumore.
Si chiamano paraneoplastiche perché in realtà non sono dovute all'effetto distruttivo diretto del tumore che cresce in un determinato tessuto.
Le sindromi paraneoplastiche si dividono in **endocrine** e **non endocrine**.

Sindromi paraneoplastiche endocrine

Le sindromi paraneoplastiche endocrine sono dovute al fatto che per esempio cellule di un tumore che provengono da un tessuto che normalmente non produce ormoni acquisiscono - per instabilità genomica - la capacità di produrre ormoni, quindi c'è quella che si dice produzione ectopica da parte dei tumori.

Tutto questo è casuale o no? Ad esempio il fatto che un tumore a piccole cellule del polmone produce ACTH con maggiore frequenza rispetto ad un altro tumore è casuale?
Non c'è una risposta, ma probabilmente non è casuale perché evidentemente in quel particolare tumore le alterazione genetiche che contribuiscono allo sviluppo di quella determinata malattia possono anche influenzare geni che sono predisposti per essere upregolati e espressi in quella cellula piuttosto che in un'altra.

Le sindromi paraneoplastiche endocrine potrebbero essere dovuta al fatto che un tumore di origine endocrina che dovrebbe produrre un determinato ormone ne produce un altro. In questi casi il paziente si presenta con una sintomatologia clinica di tipo endocrino. La causa più frequente per questo tipo di sintomi è una patologia ghiandolare, se questa viene esclusa il medico deve cominciare a pensare a una sindrome paraneoplastica. (In una diagnosi differenziale penso sempre alle cause più frequenti e poi si pensa a un tumore nascosto)

Sindormi paraneoplastiche non-endocrine
Poi ci sono le sindromi paraneoplastiche di origine non-endocrina che presentano tutta una serie di sintomi tessuto specifici che possono essere spiegati da cause molto più frequenti, tuttavia una volta che abbiamo escluso le alternative dobbiamo pensare a un tumore nascosto.

Esempio classico è quello della trombosi: in un anziano sono molto frequenti trombosi o tromboflebiti (infiammazioni delle vene) che possono essere spesso causati da un tumore che induce aumentata produzione di fattori della coagulazione o di un certo tipo di TNF eccetera.

Le sindromi paraneoplastiche non-endocrine possono essere spiegate da diversi meccanismi: il tumore produce sostanze anomale, iperproduce enzimi oppure subisce un cambiamento della

immunogenicità delle cellule tumorali che fanno sviluppare autoanticorpi che vanno a colpire le cellule sane.

STADIAZIONE DEL TUMORE

Un altro aspetto da considerare è il problema della stadiazione dei tumori. La stadiazione è la fotografia dello stato di diffusione della patologia neoplastica in un paziente.

Quando si fa diagnosi ex novo in un paziente bisogna capire fino a che punto questo tumore è avanzato. La stadiazione è fatta da un equipe: la fanno radiologi, la fanno chimici attraverso esami strumentali, la fa il chirurgo quando opera che aprendo vede esattamente come si presenta il tumore, la fa infine l'anatomopatologo.

A che cosa serve? La stadiazione aiuta a formulare una prognosi e aiuta a instaurare la terapia ottimale. Tutti i tumori sono suddivisibili in stadi, anche se in realtà per ogni tumore esistono stadiazioni specifiche rispetto a quella generale che vi descrivo oggi.
A ciascuno stadio per ogni tumore corrisponde un determinato protocollo terapeutico. Se il tumore è in fase precoce è meglio aggredirlo per bloccarne la crescita, se il tumore è già in stadio avanzato - con tutti i problemi che ne derivano - molto spesso si preferisce evitare di fare una terapia molto aggressiva che magari dà effetti collaterali pericolosi, tossici eccetera.
Quindi la stadiazione permette al medico di stabilire la terapia in base a protocolli già stabiliti che sono continuamente aggiornati.
Terza informazione importante: oggi si usa un sistema codificato internazionale per la stadiazione di tumori che si chiama TNM. Questo permette lo scambio immediato tra diversi centri: se un paziente va a curarsi da una parte e viene fatta la stadiazione può cambiare centro e portarsi dietro la cartella clinica in cui è già definito il suo stadio, quindi non c'è bisogno di ripetere tutto l'iter di per definire la stadiazione.

Parametri del sistema TNM
-T si riferisce a tutto quello che riguarda il tumore primario: dimensione, grado di diffusione e altri attributi
-N sta per stato, estensione e interessamento del sistema linfonodale: cioè se c'è o non c'è la metastasi ai linfonodi
- M sta per presenza o meno di focolai metastatici a distanza
Per ogni parametro TNM ci sono dei numeri associati a ogni lettera che rappresentano il caso di T il diametro del tumore primario, N 0-1 0 assenza di metastasi ai linfonodi locali, 1 una metastasi, 2 due metastasi, M lo stesso 0/1 mi indica assenza o presenza e il numero di metastasi. (NdR qui ho riportato quello che dice ma più avanti spiegherà meglio il significato dei numeri che non è esattamente questo)

(cfr slide 3)Per esempio la stadiazione TNM del carcinoma alla mammella
T0 la mammella non presenta tumori
T1 lesione con diametro minore di 2 cm
T2 lesione di 2-5cm
T3 la cute e/o la parete toracica sono state invase dai tumori infiltrativi

N0 non sono interessati i linfonodi
N1 sono interessati i linfonodi mobili
N2 sono interessati i linfonodi fissi

Domanda studente: Cosa si intende linfonodi fissi mobili?
La metastasi può lasciare un linfonodo facilmente palpabile oppure indurre una reazione infiammatoria che lo fa aderire al muscolo e quindi alla palpazione il linfonodo non si muove. Quindi un linfonodo fisso è indice di una maggiore aggressività del tumore

(cfr slide 4)Ancora altri parametri:
TX : il tumore primitivo non può essere identificato
T0 : non evidenza di tumore primitivo
Tis : carcinoma in situ, quindi una lesione preneoplastica che non ha ancora infiltrato, non ha ancora passato la membrana basale

Stadiazione clinica del tumore

(cfr slide 5)Per ogni tumore la combinazione di questi parametri definisce lo stadio.
I diversi stadi raggruppano parametri TNM che possono essere tra loro simili ma anche molto diversi.
Quindi per esempio un tumore allo stadio 0 è un carcinoma in situ, ci si riferisce a una lesione preneoplastica presumibilmente maligna che non ha ancora invaso.
Stadio 1: tumore circoscritto senza coinvolgimento linfonodale e senza metastasi, che avrà un suo trattamento diverso ad esempio da quello di un paziente allo stadio 2.
Stadio 2: il tumore è circoscritto, probabilmente di dimensione maggiore, con coinvolgimento linfonodale non dà metastasi a distanza
Sadio 3: tumore di maggiori dimensioni con numero maggiore di metastasi ai linfonodi senza metastasi a distanza
Stadio 4: tumore di grandi dimensioni con vasto interessamento linfonodale e metastasi a distanza

Domanda studente: Qual è la differenza tra stadio 0 e stadio 1?
E’ un argomento molto specialistico, comunque un tumore allo stadio 0 è una lesione preneoplastica. Per alcuni tumori epiteliali si possono identificare delle proliferazioni, delle lesioni formate da cellule che hanno alcune caratteristiche delle cellule tumorali maligne. Si parla quindi di displasia o di carcinoma in situ che però ancora non hanno manifestato la malignità, non hanno ancora invaso. Quindi si definiscono lesioni preneoplastiche. Possono rimanere tali ma possono anche evolvere e quindi bisogna tenerle d ‘occhio.

(cfr slide 6) Si può addirittura dividere lo stadio 2 in altri sottostadi che hanno prognosi e terapie diverse. Il concetto importante da ricordare è che si usano questi sistemi per stadiare il tumore.

(cfr slide 7)Vedete che nel carcinoma del colon la stadiazione è diversa da quella del carcinoma alla mammella.

Stadiazione molecolare del tumore

Quindi questa è la stadiazione clinica del tumore.

(cfr slide 8) Si cerca poi di fare anche la stadiazione molecolare dei tumori sulla base delle alterazioni genetiche che stanno alla base dell’alterazione neoplastica. Per ogni tumore (ad esempio del colon, della testa e del collo, della cervice, del polmone, della mammella e della prostata) conosciamo la storia naturale del tumore, cioè quali siano le fasi e gli eventi che spiegano la progressione verso una maggiore malignità.

La stadiazione molecolare nel carcinoma del colon
Il primo tumore in cui si sia cercata di fare una stadiazione molecolare è il carcinoma al colon. Si è cercato di associare a ciascuna delle fasi che dettano un avanzamento della malattia neoplastica una o più lesioni molecolari critiche.
Si è capito che il carcinoma del colon si presenta all'inizio con una fase di iperplasia dell'epitelio. Questo epitelio iperplastico evolve in adenoma, cioè un tumore benigno che può essere precoce, intermedio o tardivo e che a sua volta può evolvere a carcinoma maligno. Questo carcinoma può andare avanti e acquisire capacità di dare metastasi.

(cfr slide 10) Per ogni fase - ancora prima che si conoscessero oncogeni, oncosoppressori ecc.- venivano associate alterazioni genetiche: ad esempio la **perdita dell'eterozigosi del cromosoma 5** che segna il passaggio da epitelio normale a epitelio iperplastico. Poi si è scoperto che in quella sede è localizzato il gene **APC**.
Il passaggio da epitelio iperplastico a adenoma è invece spiegato da **ipometilazione del DNA** che normalmente regola l'espressione di oncosoppressori, oppure **l'attivazione del Ras** che si associa ad adenoma.

Quindi sappiamo che ciascuna di queste tappe è legata a una modificazione di un tumor suppressor o di un oncogene. Andando ad identificare le lesioni molecolari di un determinato momento questo sistema ci permette di dire con relativa sicurezza qual è lo stadio del tumore. Se ad esempio riscontro alterazioni in Ras, inattivazione di SMAD ma ancora non ho la perdita di p53, posso dire che questo tumore è un adenoma ma non è ancora un carcinoma.
Stiamo ovviamente trattando questo argomento in maniera molto semplificata, ovviamente ci sono altri fattori che possono contribuire all'avanzamento della patologia sulla base dei vari tronchi di lesioni molecolari.

Ruolo dei microRNA

(cfr slide 12) Questa diapositiva mira a sottolineare il ruolo dei microRNA nella progressione tumorale. I mircoRNA sono utilizzati oggi come marcatori dell'avanzamento della patologia, ma non sono oncogeni o oncosoppressori. Non entro in dettaglio era giusto per farvi capire la complessità.

Oggi disponiamo di strumenti per rilevare facilmente queste modificazioni.

Stadiazione molecolare in altri tipi di tumore

Qua c'è per esempio il **melanoma** che parte come nevo benigno, poi nevo displastico fino ad arrivare a melanoma metastatico. Qui sono elencate cinque fasi e a ciascuna di queste fasi sono associate una o più modificazioni che coinvolgono oncogeni, oncosoppressori eccetera.
Se uno fa l'esame molecolare della patologia di un paziente a questo livello riscontra delle anomalie che permettono di dire : il paziente è a questo stadio.

Ammettendo che sia corretta, questa metodologia è molto più precisa di quella clinica, ci permette di dire esattamente a quale punto dell'avanzamento è arrivato quel determinato tumore.
(cfr slide 15, 16, 17)Poi questi esempi ve li guardate con calma: tumore della vescica, tumore della prostata, adenocarcinoma pancreatico.

Numero di mutazioni necessarie per trasformare una cellula

La necessità di accumulare un certo numero di mutazioni è in linea con quello che dicevo all'inizio. Una domanda che ci si potrebbe porre è: noi sappiamo che esistono gli oncosoppressori, i tumor suppresor tutti gli altri geni implicati nel controllo della proliferazione ma basta una mutazione a trasformare una cellula? Ce ne vogliono due?

Ormai è chiaro che affinché avvenga una trasformazione neoplastica completa a secondo del tipo di tumori sono necessarie un certo numero di mutazioni che vanno a interessare oncogeni, oncosoppressori, geni che controllano il meccanismo di riparazione del DNA eccetera.

Questo spiega anche perché il tumore si manifesti in età tardiva: occorre un certo periodo di tempo perché si accumuli il numero di lesioni necessario a far trasformare la cellula.
(cfr slide 20)La necessità di coinvolgere un certo numero di alterazioni genetiche che vadano a colpire l'organismo in diverse classi di geni regolatori dei tumori per trasformare una cellula, è stata dimostrata nel 1999 da Weinberg(precedentemente ci si era fatti delle idee sbagliate perché negli esperimenti in vitro si usavano delle cellule alterate).
Questo esperimento ha dimostrato per la prima volta che per trasformare una cellula tumorale in vitro è stato necessario modificare cioè trasfettare diversi geni cioè la telomerasi, Ras, proteina Rb, p53 e una fosfatasi. E' stato così definito per lo meno in questo modello il numero di geni da modificare . Solo facendo queste cose contemporaneamente è stato possibile trasformare in vitro una cellula normale.

(cfr slide 21) Ora noi sappiamo come dicevo all'inizio che questi hallmarker sono allargati e comprendono anche lo stroma, la componente infiammatoria, l'infiltrato, le citochine eccetera.

(cfr slide 22) Questa slide ricapitola quindi i vari circuiti che devono essere modificati per trasformare una cellula.

CARATTERISTICHE DELLA PROLIFERAZIONE NEOPLASTICA

Parliamo adesso delle caratteristiche della proliferazione neoplastica.

Origine monoclonale del tumore

Un tumore si presenta come un ammasso di cellule che possono essere apparentemente molto diverse tra loro da punto di vista fenotipico e nelle le loro proprietà: è dovuto all'espansione monoclonale o di cloni diversi?
Si è tentato di rispondere a questa domanda, e anche se una risposta definitiva non c'è ci sono dei concetti che prevalgono.
Si ritiene che il tumore derivi da un'unica cellula somatica, cioè che provenga da una cellula che ha subito modificazioni genetiche che la trasformano e che trasmette alla figlia. Questa cellula alterata durante la proliferazione continua ad accumulare modificazioni genetiche, per cui da questo clone derivano dei **sottocloni**, ma questi sottocloni in realtà originano da un'unica cellula.
I sottocloni che partono dalla cellula iniziale possono acquisire delle proprietà che conferiscono loro una sempre maggiore malignità, per cui possono prevalere su altri sottocloni.

Tali alterazioni sono diverse da tumore a tumore anche nell'ambito di una stessa massa tumorale. Addirittura nell'ambito di una massa neoplastica sono stati identificati fino a 50 cloni diversi originatesi dalla "deriva genetica" del clone iniziale.

Nella massa tumorale ci sono tanti sottocloni che possono avere comportamenti e caratteristiche fenotipiche molto diverse tra loro. Alcuni di questi cloni possono aver acquisito quelle

caratteristiche che conferiscono loro la capacità di dare le metastasi. Capacità che non vuol dire che diano per forza metastasi ma sono le proprietà importanti per far partire il processo che però è un processo molto difficile, tanto che ci sono malattie in cui non va mai in porto.

Prove a supporto dell'ipotesi dell'origine monoclonale del tumore

Quali sono le prove che i tumori sono di origine monoclonale?

1. Aberrazioni cromosomiche

Per esempio abbiamo parlato delle **aberrazioni cromosomic**he: abbiamo detto che esistono quelle primarie e secondarie.
Le aberrazioni cromosomiche primarie sono aberrazioni cromosomiche specifiche di quel tumore: tutte le cellule di quel tumore possiedono quella determinata aberrazione. Già questo ci suggerisce una probabile origine comune che ha dato inizio alla trasformazione neoplastica. Ci sono anche altre correnti che non sono d'accordo, ma il dogma è questo qui.

2. Mieloma Multiplo

Un'altra prova è il **mieloma multiplo** che rientra nelle patologie neoplastiche delle cellule del sistema ematopoietico. Non è una leucemia, con il termine leucemia ci si riferisce a monociti, cellule mieloidi e linfoidi. (Ndr registrazione poco chiara credo abbia detto mieloma) si riferisce a una plasmacellula che raramente leucemizza (cioè si trova nel sangue in maniera elevata). In genere si localizza nel midollo osseo e lì c'è espansione, può succedere che vadano in circolo ma non è una leucemia.
Una delle caratteristiche di questi mielomi è che nel 90% si ha produzione di Ig monoclonale, cioè in quel determinato paziente si riscontra un'unica tipologia di Ig. Ciò è facilmente rilevabile quando si fa l'esame del sangue con un tracciato elettroforetico perché la zona del tracciato delle gammaglobuline mostra un picco. Se invece abbiamo un'infezione(in cui si ha attivazione delle plasmacellule e della produzione di Ig) non abbiamo un picco ma una crescita con andamento largo, una curva gaussiana.
Si può rilevare se si colora con il blotting. Individuare in un paziente un picco elettroforetico è una spia importante che ci dice che potrebbe esserci un mieloma multiplo.

Questa è la dimostrazione che c'è un'unica cellula interessata.

Se noi studiamo 10 pazienti con il mieloma multiplo (ammesso che tutti producano immunoglobuline), producono tutti la stessa immunoglobulina o immunoglobuline diverse?
Sono diverse ovviamente perché gli anticorpi diversi potenzialmente producibili dai linfociti sono milioni, miliardi per cui la probabilità che questi pazienti producano la stessa Immunoglobulina è bassissima.
Tant'è vero che la patologia associata al mieloma (oltre alla proteinuria di Bence Jones dove io espello le catene leggere delle immunoglobuline perché queste attraversano la barriera renale) è **l'amiloidosi primaria**.

Tutti che i pazienti affetti da mieloma multiplo sviluppano amiloidosi? No, dipende dalle caratteristiche dell'immunoglobulina prodotta.
Come mai alcune Ig possono essere suscettibili di deposizioni di amiloide e altre no? Dipende dalla porzione ipervariabile: se ha una sequenza che favorisce la formazione di foglietto

β ripiegato allora quella Ig tenderà a depositarsi assieme ad altri cofattori.
Esistono anche i mielomi silenti che non producono Ig.

Domanda studente

: Cosa vuol dire amiloidosi primaria?
Si definisce amiloidosi primaria un'amiloidosi di cui sia sconosciuta la causa al momento della diagnosi, molto spesso l'amiloidosi primaria è spiegata in realtà dalla presenza del mieloma.

3.Espressione di geni contenuti nel cromosoma X nelle cellule tumorali della donna

(cfr slide 29) Vado ad analizzare alcuni enzimi presenti nel cromosoma X nelle cellule tumorali della donna. Essendo la donna un mosaico, se il tumore fosse di origine policlonale dovremmo avere 50 % di espressione di un isoenzima rispetto all'altro, mentre in realtà abbiamo un solo isoenzima. Questo ci suggerisce che l'origine è monoclonale.

Origine staminale del tumore

Un tumore deriva da una cellula terminale già differenziata che diventa neoplastica, da una cellula staminale in cui avvengono alterazioni genetiche varie che dà poi origine a cellule maligne, oppure da un progenitore indirizzato derivante da una cellula staminale?

Oggi si tende a credere che almeno in certi tumori la cellula d'origine sia quella staminale.

Ad esempio nelle leucemie, in questo esempio nelle **leucemie linfatiche**, si ritiene che il danno avvenga a livello di una cellula staminale già indirizzata, poi questa cellula trasformata può maturare verso la linea B o la linea T e il blocco della differenziazione può avvenire a diversi livelli. Può avvenire a livello di una cellula molto immatura e quindi avremo una leucemia linfatica acuta, oppure dopo un percorso di differenziazione e quindi parleremo di leucemie linfatiche croniche. Nel caso dei linfociti B la cellula può maturare anche fino a plasmacellula, mantenendo alcune caratteristiche delle plasmacellule come per esempio la produzione monoclonale di immunoglobuline (ma non è detto che la plasmacellula tumorale per forza produca Ig).

(cfr slide 33) Un'altra prova dell'origine a livello della cellula staminale è la leucemia mieloide cronica che è dovuta ad alterazioni cromosomiche che portano alla produzione di **BCR/ABL**. Questa alterazione probabilmente avviene a livello della cellula staminale e questa può produrre **leucemia mieloide cronica** .
Questo Bcr/Abl può originare proteine con diverso peso molecolare: se si forma **p210** origina la leucemia mieloide cronica, se si forma la **p140** non si ha più la leucemia mieloide cronica ma si ha una leucemia linfatica.
Molto spesso può succedere che la leucemia mieloide cronica **blastizzi**, cioè diventi acuta: in circolo si vedono elementi leucemici non più maturi ma immaturi. Uno si aspetta che quando una leucemia mieloide cronica blastizza faccia apparire cellule mieloidi immature. La blastizzazione verso leucemia mieloide acuta avviene nel 70% dei casi, ,ma nel 20-30% assume la faccia della leucemia linfatica acuta. Questo è possibile perché l'origine di questo tumore è a livello della staminale che a un certo punto impazzisce e invece di maturare verso la linea mieloide matura verso la linea linfoide.
(La diapositiva confonde perché c'era scritto leucemia mieloide però se andate a vedere sopra c'è scritto linfoide)

Ci sono ancora altre teorie che riguardano la possibilità di una cellula matura di dedifferenziare. L'ipotesi della dedifferenziazione non è accettata da molti, ma non è da escludere soprattutto alla luce delle scoperte recenti sulle cellule staminali che possono dedifferenziare.

Cellula Staminale Cancerosa
Ecco un altro interessante modello.
(cfr slide 35, legge la didascalia) Sintesi del concetto di evoluzione clonale e del concetto di cellula staminale cancerosa
Dall'alto al basso: l'evoluzione clonale della cellula alterata dà origine a cloni che assumono caratteristiche delle cellule maligne. La prima mutazione avverrebbe in una cellula staminale o in una cellula progenitrice o in una cellula differenziata, qui si lascia aperto. Questa mutazione risulta nella crescita di una lesione benigna geneticamente omogenea.
Una seconda mutazione colpisce una delle cellule della lesione benigna causando lo sviluppo di cloni più maligni e invasivi.
Poi avviene un terzo colpo comporta che la cellula inizi a invadere, infiltrare e quindi dare metastasi. Possono coesistere dei cloni con caratteristiche genetiche indipendenti che però hanno lo stesso precursore .
Alla fine questa cellula assume le caratteristiche di una cellula staminale molto indifferenziata: assume la faccia di una completa indifferenziazione che rispecchia il profilo di una cellula staminale.
<u>Apparentemente è come se tornasse indietro, in realtà è un processo di acquisizione di proprietà sempre più maligne.</u>
Questo concetto di origine dei tumori da parte di una cellula staminale è molto importante dal punto di vista terapeutico, perché le cellule staminali che sono cellule ad alta capacità proliferativa, sono **molto resistenti alla chemioterapia**. Quindi spiegherebbero le recidive: essendo sono molto resistenti raramente sono uccise dagli agenti che bloccano la proliferazione, e sono anche in grado di ripescare elementi di resistenza ai farmaci. Il problema oggi è cercare di uccidere le cellule staminali responsabili della proliferazione e della crescita del tumore. <u>Quindi ora c'è grande interesse nel cercare di colpire la cellula staminale.</u>

(cfr slide 38)Questa figura è una specie di riassunto degli avanzamenti della ricerca sul campo, si parla di transizione epitelio mesenchimale di cui parleremo più avanti.

(cfr slide 39) **CARATTERISTICHE DELLA PROLIFERAZIONE NEOPLASTICA (2)**

-Autonoma
-Atipica
-Aggressiva
-Continua , progressiva ma variabile nel tempo
-Afinalistica

Autonoma

(cfr slide 40, il professore legge tutta la slide) Il concetto è che la cellula tumorale benigna prolifera in maniera autonoma, se ne infischia dei meccanismi di regolazioni interni o esterni alla cellula, forniti dall'ambiente, da ormoni o da segnali vari.
Questo è intuibile se si pensa agli oncogeni che possono codificare per recettori di fattore di crescita che sono sempre attivi anche in assenza di ligando.

Nell'ambito dell'autonomia ci sono sempre le eccezioni: ad esempio nei tumori di origine endocrina che possono rimanere per un certo periodo di tempo suscettibili all'azione (NdR registrazione poco

chiara credo abbia detto ormonale).
Il concetto è che si ha una proliferazione incontrollata: è autonoma nel senso che non risente dei sistemi di controllo.

Atipica
E' un termine un po' ambiguo, ha molti aspetti.
(cfr slide 41, il professore legge la slide) Nei tumori maligni si ha la vera atipia e la sua entità si esprime in termini di distanza dal tessuto di origine attraverso tre gruppi di parametri:
a) **immaturita',** l'anaplasia è mancata differenziazione ed è legata a meccanismi che portano a perdita della differenziazione, alla mancata differenziazione, non a una dedifferenziazione.(anche se poi abbiamo visto che secondo l'idea della cellula staminale in realtà ci potrebbe essere anche un ritorno indietro). Comunque si ritiene che l'anaplasia sia dovuta a mancata differenziazione.
b) **metaplasia**, cambiamento della differenziazione nell'ambito dello stesso foglietto embrionale
c) **differenziazione anomala**

Continua , progressiva ma variabile nel tempo

(cfr slide 42) La crescita tumorale è continua e progressiva nel tempo quindi la domanda è: quali sono i meccanismi associati a questo fenomeno?
La cinetica della crescita tumorale dipende da una serie di fattori.

Frazione di Crescita

La frazione di crescita, o growth fraction, si riferisce alla frazione di cellule all'interno della popolazione che si trova in fase replicazione, la percentuale di cellule che in quel momento stanno proliferando.
Quindi si può dire che la frazione di crescita superiore di un tessuto tumorale spieghi l'aumentata proliferazione? Può essere, ma in realtà <u>la frazione di crescita è solo uno dei fattori che determinano questo fenomeno.</u> La frazione di crescita è variabile nel tempo: ci sono fasi in cui il numero di cellule in replicazione all'interno della massa tumorale è molto alta, altre in cui non lo è.
La maggior parte delle cellule all'interno di un tumore clinicamente individuabile non si trovano in replicazione. Anche tumori a crescita rapida hanno una growth fraction di 20%, quindi è un fattore che può contribuire ma è molto variabile.
La frazione di crescita si può misurare con diversi strumenti: si possono marcare le cellule, si può utilizzare il citofluorimetro. Utilizzando queste marcature specifiche trovo le cellule che in quel momento stanno proliferando.

Tempo di generazione

Un altro parametro può essere il tempo di generazione, cioè il tempo che una cellula impiega a dividersi. Uno intuitivamente penserebbe che una cellula tumorale raddoppi più velocemente rispetto a una cellula sana.
(cfr slide 46) Invece non è così.
Il tempo d replicazione è determinato da diverse fasi che hanno tempistica identica in tutte le cellule, quello che varia è la fase G1. Qui vediamo alcuni tipi cellulari e il tempo indicativo impiegato per compiere un intero ciclo replicativo.
Cellule del midollo osseo, dell'intestino, che notoriamente replicano molto, hanno un ciclo replicativo veloce, a differenza di altre cellule che sono invece molto lente.
<u>Se si esamina il tempo di raddoppiamento delle cellule tumorale si scopre che è ancora più lungo di quello delle cellule normali.</u>
(cfr slide 47)Il tempo di generazione è ovviamente molto variabile da tumore a tumore o anche

all’interno dello stesso tumore, qui nella tabella vi fa vedere che nel carcinoma primario dei bronchi ho due tempi di replicazione molto diversi a seconda delle fonti.
Neanche questo parametro spiega dunque l’aumento della proliferazione.

Quindi la frazione di crescita può essere aumentata ma non sempre, il tempo di raddoppiamento è addirittura molto spesso superiore rispetto alle cellule normali.
Altro tratto è l’entità di perdite cellulari: cioè il volume delle cellule è determinato dal rapporto tra le entrate (cellule che proliferano) e le uscite cioè cellule che muoiono, soprattutto per apoptosi.
L’accumulo di cellule, che si traduce in una crescita progressiva del tumore, può essere spiegata da uno sbilancio tra la produzione e la perdita di cellule. Per cui i tumori, specialmente quelli dove c’è un’elevata produzione di fattori di crescita, oppure tumori in cui è l’apoptosi che condiziona la proliferazione della massa che cresce.
Questa è una tabella che vi fa vedere le percentuali di epiteliociti colonrettali apoptotici prelevati in tessuti normali e neoplastici in varie fasi della malignità.
La percentuale delle cellule in apoptosi nel tessuto sano è maggiore rispetto a quella del tessuto tumorale, inoltre questa percentuale continua a decrescere all’aumentare della malignità.
Questo è un fattore molto importante condizionante la crescita della massa neoplastica.

Tempo di generazione e chemioterapia
Il fatto che le cellule tumorali - soprattutto in certi tumori - raddoppino più lentamente rispetto alle cellule normali, è sfruttato proprio dalla chemioterapia.
La chemioterapia si basa su farmaci che bloccano la proliferazione, ma questi farmaci non sono specifici per le cellule tumorali: bloccano la proliferazione di tutte le cellule.
Quindi questi farmaci in teoria sono tossici per tutte le cellule, soprattutto per le cellule sane che normalmente proliferano: per esempio per le cellule del midollo. Infatti nei pazienti trattati con questi farmaci antiproliferativi si hanno effetti collaterali che possono essere gravi per l’uccisione di queste cellule: carenze di granulociti, anemie eccetera.
Si sfrutta questa proprietà facendo cicli: si fa un primo ciclo ammazzando le cellule tumorali e anche quelle sane del paziente, alla fine del ciclo le cellule sane si riprendono più velocemente rispetto a quelle tumorali. Si aspetta un po’ di tempo per dare modo al midollo di ricostruirsi, si danno fattori di crescita per favorirne la ripresa, poi si dà la seconda botta di farmaci, con la seconda botta si fa fuori tutto, poi di nuovo le cellule sane si riprendono più in fretta.

Domanda studente: Come mai le cellule sane si riprendono più velocemente?
Perché la durata del loro ciclo è minore, quindi proliferano più velocemente e il loro numero si ristabilisce prima delle cellule tumorali.

Lezione di Patologia generale e fisiopatologia clinica (sem2) del 8/5/2013 (1)

Prof. Minuz

Sbobinatore: Caterina Butturini

Revisore: Roberta Castellani

INSUFFICIENZA PRE-RENALE

Nella scorsa lezione avevamo introdotto l'insufficienza renale e pre-renale, che è quella determinata da un'alterazione della perfusione renale che esce al di fuori del range di autoregolazione e il rene diventa ipofunzionante, con **riduzione della filtrazione glomerulare**.

In questa condizione, aumenta enormemente la capacità di riassorbimento prossimale e, in tutto il decorso del nefrone, quello di acqua e di sodio, per cui i volumi renali e l'escrezione renale di sodio si riducono enormemente.

Allo stesso tempo aumenta la concentrazione degli altri soluti, quelli che non vengono riassorbiti nel tubulo, per cui l'osmolarità aumenta. Il **peso specifico** delle urine è alto ed è usato talvolta come criterio diagnostico, ma è un po' infido perché è il rapporto tra urea e creatinina: infatti l'urea è filtrata e quindi è un indice di filtrazione, però quando si riduce il filtrato glomerulare c'è una componente di riassorbimento che prevale, per cui l'azotemia nel sangue aumenta moltissimo nell'insufficienza renale e pre-renale, più di quanto invece non aumenti la **creatininemia**, che è invece un indice preciso, non invasivo di filtrazione glomerulare e quindi segue una cinetica parallela a quella della variazione del filtrato glomerulare.

Di solito, salvo che non si protragga nel tempo portando all'ischemia renale (rene ischemico= ipoperfusione renale cronica), non si osserva alterazione del sedimento urinario, cioè possono esserci cilindri, ma questi non sono mai presenti in elevata quantità. Quindi il sedimento urinario non è un buon indicatore di danno organico, che ovviamente è presente solo se (*ndr registrazione disturbata*).

INSUFFICIENZA INTRINSECA PARENCHIMALE

Nella **forma intrinseca parenchimale**, invece, l'escrezione di sodio rimane relativamente alta, perché viene alterata la capacità del tubulo di riassorbire. Se c'è un disturbo del filtrato glomerulare, dove ci sia una glomerulonefrite, una riduzione, questo non si ripercuote necessariamente in una variazione del flusso ematico nei *vasa recta*, per cui le modalità di riassorbimento tubulare non sono necessariamente alterate in senso pro-ritentivo per acqua e sodio. Di conseguenza l'escrezione renale di acqua e sodio viene mantenuta su valori para-fisiologici in molti casi.

La concentrazione delle urine e, meno evidente, la capacità di modulare il riassorbimento di sodio nelle forme tubulari è tipicamente alterato. Anche per questo motivo l'escrezione di acqua e di sodio è più alta e quindi la concentrazione delle urine non è elevata, il peso specifico delle urine è invariato e la variazione di azotemia e creatininemia tendono ad essere consensuali.

Di solito sono presenti nel sedimento urinario cilindri, detriti cellulari, cellule dell'epitelio tubulare, eritrociti che sono manifestazione del danno organico, dell'impegno infiammatorio o della alterazione del riassorbimento delle proteine, per cui si compattano residui cellulari, emazie e proteine a formare i cosiddetti **cilindri**, che sono degli aggregati non solubili che sono presenti nel

sedimento urinario. Sono spia di un danno organico importante, quindi tenete presente che- da un punto di vista pratico- la loro presenza nelle urine, deve essere sempre un segnale di allarme per una patologia organica renale.

Quasi sempre nell'insufficienza renale si ha comunque una riduzione del volume urinario, cosa che accade tipicamente nella forma pre-renale, ma anche nelle gravi formi parenchimali.

Nella fase di riparazione del danno, nelle forme prerenali si ha una ripresa della diuresi, invece nelle forme parenchimali dove vi sia stato un danno tubulare si ha un'escrezione di acqua e di sodio, che tende ad essere più elevata, perché la riparazione del danno glomerulare spesso non si accompagna ad un'adeguata capacità di modulare il riassorbimento, perché la struttura cellulare del nefrone e la sua architettura sono parzialmente alterate e anche l'interstizio potrebbe avere una minore tonicità. Per cui non sempre -soprattutto nelle fasi iniziali della riparazione- si ha un ripristino dell'equilibrio, con il determinarsi invece di una fase poliurica transitoria molto frequentemente.

INSUFFICIENZA OSTRUTTIVA POSTRENALE

Le forme ostruttive post-renali sono determinate dalla presenza di un ostacolo a livello delle vie escretrici che determina un meccanismo di alterazione del flusso dell'urina e, analogamente a quanto avveniva nelle forme da ostruzione tubulare (dove si aveva un ostacolo al flusso della pre-urina o dell'ultrafiltrato), si ha un incremento della pressione idrostatica, che determina un ostacolo al processo di filtrazione, in quanto il differenziale tra la pressione idrostatica intracapillare e quella interstiziale tende ad attenuarsi.

Quindi in queste condizioni la filtrazione glomerulare decresce: si riduce notevolmente in funzione dell'aumento della pressione tubulare.

Moltissime condizioni che ostacolano le vie escretrici possono determinare una situazione di questo genere: ovviamente, se l'ostacolo coinvolge entrambi gli ureteri (pensiamo, per esempio, ad un'estesa neoplasia oppure ad una fibrosi retro-peritoneale, ossia un processo infiammatorio dell'avventizia dell'aorta che determina una compressione dall'esterno sugli ureteri) questo determina un contemporaneo ostacolo all'escrezione urinaria, una ritenzione idrosalina a livello del tubulo, a cui segue una diminuzione della sua pressione idrostatica tubulare e una cessazione del processo di filtrazione glomerulare.

Oppure, altre condizioni che vadano a valle della vescica, come un'ipertrofia prostatica, in cui si osserva una dilatazione della vescica, un aumento della pressione degli ureteri e poi, per via ascendente, anche dei calici renali e infine dei tubuli, portando ad un arresto della filtrazione.

Tenete presente che una condizione di questo tipo, se protratta nel tempo, determina un progressivo incremento della pressione dell'interstizio, per cui il parenchima renale subisce una compressione: si determina un'**idronefrosi**, cioè un esteso ampliamento delle cavità escretrici, con compressione del parenchima renale. Pertanto, non ci sarà solo un ostacolo alla filtrazione a causa dell'aumento della pressione idrostatica, ma nel tempo si può determinare anche un deficit strutturale, per atrofia della corticale renale.

Quindi sono condizioni abbastanza comuni, molto spesso risolvibili: esempio classico è quello del calcolo renale che si incunea a livello della vescica, determina una distensione, i sintomi associati (dolore) e l'arresto della filtrazione glomerulare. Però se il calcolo viene rimosso, ci potrà essere

una ripresa della diuresi e il danno parenchimale da compressione sarà limitato; se però dura nel tempo diventa invece un danno irreversibile.

Quindi le condizioni di insufficienze post-renali o ostruttive sono abbastanza comuni, ma richiedono un impegno di entrambi i reni per determinare un'evidenza di insufficienza renale, per lo meno nelle fasi iniziali. Se protratta nel tempo comunque anche un'insufficienza monolaterale del rene, può determinare condizioni che peggiorano le funzionalità dell'altro rene con sviluppo di ipertensione e di tutte le condizioni tipiche di insufficienza renale, anche se compensato dal funzionamento dell'altro rene.

CLEARENCE DELLA CREATININA COME INDICE DELL'I.R.

Qualsiasi sia il meccanismo che determina l'insufficienza renale, l'esito è quello di una riduzione della capacità di filtrazione glomerulare, per cui l'evidenza di uno stato di insufficienza renale è data egregiamente dalla misura della **creatinina nel plasma**.

La creatinina si genera in funzione della massa muscolare ed è in parte modificata dall'attività muscolare o dallo stato di atrofia muscolare; al di fuori di questo, la quantità di creatinina che si genera è filtrata ed escreta senza subire un particolare metabolismo intrarenale, per cui il riassorbimento e l'escrezione sono modesti.

Nell'insieme la variazione della creatinina del plasma, se non determinata da alterazioni della struttura muscolare, è determinata dalla capacità escretrice del rene che a sua volta è determinata dalla capacità di filtrazione glomerulare. Quindi il semplice rapporto tra escrezione urinaria per unità di tempo su concentrazione plasmatica della creatinina (**clearance della creatinina**) rappresenta egregiamente il **GFR** (Glomerular Filtration Rate), cioè il tasso di filtrazione glomerulare.

Quello che appare evidente è che la crescita della creatinina avviene in modo esponenziale per bassi valori di filtrato glomerulare, mentre variazioni ampie di un range di filtrato più elevati sono meno evidenti. Ciò è espressione della capacità adattativa del rene: finché non si ha un deficit di superficie filtrante, o un deficit di capacità filtrante per unità di tempo elevato, si stenta a trovare un aumento della creatinina.

Questo non vuol dire che non ci sia nulla in questa area, perché comunque abbiamo una riduzione del 50% del filtrato, per cui ci deve essere una forte attenzione alle variazioni anche minime iniziali della creatinina, in quanto indice di inizio di insufficienza renale.

Proprio per questo motivo, nelle recenti classificazioni si trova che anche le più piccole variazioni di creatinina sono indice di insufficienza renale. Per esempio, consideriamo una glomerulonefrite: ho una riduzione della superficie filtrante e dunque avrò un aumento della creatinina, con un raddoppio del valore di base, solo in presenza di una riduzione del 50% dei glomeruli, ovvero quando vi è già un danno esteso; se, invece, a causa di un processo infiammatorio vi è solo una riduzione del 25% dei glomeruli (che comunque non è poco), il danno potrebbe non essere rilevato per nulla guardando i livelli della creatininemia. Per questo è più sensibile il calcolo, anche indiretto mediante formule, del filtrato glomerulare, di quanto non sia il livello assoluto di creatinina. Il livello di creatinina è poco sensibile per leggere le iniziali alterazioni del filtrato glomerulare che corrispondono alle classi funzionali I e II, cioè una riduzione fino al 60% del filtrato.

Quindi la fase iniziale è espressione di una riserva funzionale, ma è anche spia di un danno mascherato: anche una piccola variazione della creatinina e del filtrato glomerulare, compreso nel range tra 120 e 80, esprime già al di sotto di 80 una significativa alterazione della funzionalità renale.

POTASSIEMIA COME INDICE DELL'I.R.

C'è un secondo indice di insufficienza renale, che è espressione della funzione, ossia la **potassiemia**: il potassio viene riassorbito prossimalmente, in larga misura come funzione del carico e del filtrato di potassio. La quantità di potassio presente nel sangue resta costante fino a che non si arriva a livelli di filtrato glomerulare molto ridotti, dopodiché si ha un incremento piuttosto brusco. Perciò un aumento della potassiemia, imputabile ad un'insufficienza renale, è sempre espressione di un elevato grado di danno.

CONTROLLO DELLA NATREMIA E IPERTENSIONE ARTERIOSA:

L'aspetto apparentemente poco spiegabile dell'insufficienza renale è che la capacità di metabolizzare il sodio da parte del rene tende ad essere mantenuta in modo sproporzionatamente elevato in molte condizioni.

Il riassorbimento del sodio avviene a diversi livelli:

- nel tubulo prossimale, dove c'è soprattutto un **controtrasporto Na+/H+**, il riassorbimento paracellulare;

- un **cotrasporto Na+/K+/2Cl-** a livello dell'ansa di Henle, che è il trigger per il feedback tubulo-glomerulare: un'alta attività di questo trasportatore inibisce la secrezione di renina, una bassa attività è invece di stimolo per la COX a produrre prostaciclina e a rilasciare renina;

- un **cotrasporto Na+/K+** a livello del tubulo convoluto distale;

- **canali del sodio aldosterone-sensibili** a livello del tratto distale del tubulo.

Tutto questo insieme determina una finissima regolazione dell'escrezione del sodio.

Se però guardiamo un soggetto con insufficienza renale come varia la natremia troveremo che questa rimane molto costante, il che vuol dire che l'apparente incapacità di eliminare sodio o non c'è o viene in qualche modo mascherata da variazioni di volume.

Questo in parte spiega perché la concentrazione del sodio non vari: se aumenta il sodio, che è il principale soluto nell'ambiente extracellulare, aumenta la quantità di acqua e quindi si ha una diluizione; il patrimonio salino è aumentato, ma non vedo un aumento della concentrazione.

Il secondo motivo per cui il sodio non aumenta è che in molte condizioni si ha una perdita di sodio sproporzionatamente maggiore dell'atteso, perché in molti casi la funzionalità della midollare renale non è tale da permettere un adeguato riassorbimento. Questo accade ad esempio, nella necrosi tubulare, nelle interstizio-patie, nel danno ischemico, in cui il riassorbimento tubulare del sodio non

è più così finemente regolato, per cui la perdita di sodio, anche su volumi ridotti, tende ad essere sproporzionata rispetto all'atteso. Questo rende ragione di un'altra cosa: una dieta ricca di sodio in un soggetto con insufficienza renale può determinare un aumento della ritenzione idrosalina e di conseguenza un aumento di pressione arteriosa e quindi una pressione di perfusione nei glomeruli residui (se parliamo di un'insufficienza data da una glomerulonefrite) tale da determinare un ulteriore danno parenchimale.

Quello che determina la ritenzione idrosalina è un incremento di pressione, migliorando nel glomerulo filtrante la pressione di perfusione e quindi si ha una maggiore escrezione di acqua e di sodio, quindi l'**ipertensione** è una sorta di meccanismo di compenso che si determina nell'insufficienza renale e che è presente in moltissimi casi: nel 90% dei soggetti con insufficienza renale è presente ipertensione arteriosa.

In questa curva (*ndr. riferimento a slide 46*): pressione alta determina alto filtrato nei glomeruli che possono filtrare o comunque migliora la pressione di perfusione nei reni, determinando una capacità di filtrazione maggiore e una relativa perdita di acqua e di sodio, a scapito però di un elevato livello di pressione arteriosa.

RIASSUNTO GENERALE

Riassumendo un po' i concetti generali, l'insufficienza renale si manifesta dal punto di vista del filtrato glomerulare sempre in modo relativamente tardivo rispetto al danno presente.

Di solito si può apprezzare attraverso la misura della creatinina plasmatica solo quando il filtrato è già ridotto, quindi il calcolo del filtrato glomerulare è importante perché è spia di precoci alterazioni organiche del rene.

Anche se il danno è puramente glomerulare si ha sempre una disfunzione di tutto il nefrone e, viceversa, se anche il danno è tubulare (forme ostruttive, necrosi tubulare) questo si ripercuote in un danno di glomerulo e alterata funzione glomerulare per cui alla fin fine il filtrato glomerulare è indice comunque dello stato di insufficienza renale.

Infine l'escrezione di soluti, compreso il sodio, dipende dalla stato funzionale del tubulo.

- Nelle forme pre-renali, nella fase acuta il danno è solo funzionale, perciò non avete sodiuria perché il tubulo è integro e riassorbe.

- Nella necrosi tubulare il sodio è presente nelle urine perché il tubulo è danneggiato e non è in grado di riassorbire, disperdendo quindi sodio. Potrà disperderlo in misura limitata per cui comunque genera ritenzione idrosalina, perciò non è un valore assoluto, ma una relativa incapacità.

- Ci sono alcune situazioni, meno frequenti della regola (10%), in cui si ha una reale dispersione di sodio, cioè la perdita urinaria di sodio è molto elevata, però non è la regola dell'insufficienza renale.

INSUFFICIENZA RENALE CRONICA

Quando l'insufficienza renale è determinata da danni organici non riparabili, per esempio il danno del glomerulo nel diabete o nell'ipertensione, dovute a iperfiltrazione e a sclerosi glomerulare (il danno della componente vascolare), si determina una condizione non reversibile, che tende anzi a progredire verso un grado di più grave insufficienza, protratta nel tempo (in seguito ad un'osservazione effettuata per mesi) e per la quale non c'è reversione del processo, portando dunque allo sviluppo di una insufficienza renale cronica.

Si determina allora un'insufficienza renale cronica, che ha in sé una tendenza alla progressione perché si sviluppa:

- ipertensione arteriosa;

- altri meccanismi di danno perché la malattia di base (diabete) non è corretta;

- il processo infiammatorio non è correggibile (glomerulonefrite);

- il processo di danno vascolare (vasculite) non è correggibile;

- forme genetiche con alterazioni strutturali del nefrone, come il rene policistico.

In tutti questi casi avremo una necessaria progressione dell'insufficienza renale. Caratteristica propria dell'insufficienza renale cronica è di essere progressiva e portare verso un filtrato glomerulare sempre più ridotto.

SINDROME UREMICA

Quando il filtrato glomerulare è molto ridotto, calcolato al di sotto dei 25 ml/min, si determinano per definizione le condizioni di insufficienza renale avanzata, grave e terminale, che condiziona una **sindrome** (insieme di segni e manifestazioni cliniche) **di uremia**.

In questi soggetti la progressione del danno renale è tale da compromettere la possibilità di sopravvivenza, per cui molto spesso si ricorre al trapianto renale o alla dialisi, perché, determinando un'incapacità di eliminare soluti e una persistente alterazione idro-elettrolitica e di alcune funzioni renali, si pone una situazione del tutto incompatibile con la vita.

Le caratteristiche proprie della sindrome uremica e quindi la grave insufficienza renale costituiscono un quadro complesso:

- filtrato ridotto;

- ipertensione arteriosa, che è l'inevitabile conseguenza della ritenzione idrosalina che comunque tende a verificarsi nella maggior parte dei casi;

- di conseguenza si sviluppa anche una cardiopatia;

- alterazione di alcuni soluti, in particolare i fosfati (iperfosfatemia) e ipocalcemia, a cui si accompagna un deficit di ossificazione (per alto PTH e deficit di vitamina D);

- alterazione delle proteine del sangue e proteinuria, che non sempre c'è, ma se c'è avremo perdita di alcune componenti plasmatiche con alterazione dell'emostasi per riduzione dell'antitrombina III, aumento del fibrinogeno, variazioni di alcune proteine della coagulazione, con conseguente sindrome trombofilica e la tendenza ad avere un'accelerata aterosclerosi;

- iperpotassiemia;

- aumento dell'acido urico (iperuricemia), la cui escrezione segue quella del potassio, anche se avviene ovviamente mediante canali di trasporto diversi;

- anemia per deficit di eritropoietina, molto frequente e tipica;

- alterazioni neurologiche, immunologiche, tutte per variazione della concentrazione di alcune sostanze, in seguito a stimoli infiammatori (spesso la flogosi è sottostante), effetti tossici di alcune sostanze trattenute dal rene non funzionante, per cui si associano anche gastrite e manifestazioni multi-organo;

- acidosi metabolica.

L'**iperpotassiemia** è l'aspetto più caratteristico e uno dei motivi che portano alla necessità della dialisi. Può arrivare a livelli di cardiotossicità molto elevati con rischio di morte per arresto cardiaco: valori di potassio che superano rapidamente 6 mmol/L in condizioni di insufficienza renale, possono poi salire ulteriormente.

In condizioni normali, se l'assunzione di potassio è bassa e quindi poco rilevante, ho un'escrezione urinaria molto bassa e il riassorbimento è distribuito in maniera simile a quella del sodio: un elevato riassorbimento prossimale e poi una quota progressiva di riassorbimento nel tratto distale del tubulo. Se aumento l'assunzione di potassio, ho un'escrezione molto più alta.

La quantità di potassio escreta, anche in presenza di alti volumi di perfusione renale può anche superare gli introiti: cioè se io prendo molto potassio, però ho un filtrato molto elevato, l'escrezione renale di potassio può determinare un bilancio negativo, essendo molto alta e il riassorbimento è costante, ma tutto sommato si mantiene una secrezione molto elevata, quindi c'è un riassorbimento e una secrezione e il bilancio può essere negativo.

DOMANDA: Se il bilancio è negativo vuol dire che il potassio va anche dai capillari peritubulari nel tubulo?

RISPOSTA: C'è un meccanismo di riassorbimento e un meccanismo di secrezione.

La secrezione è funzione del flusso: tanto più è elevato il flusso, tanto più viene attivato il meccanismo di secrezione, quindi c'è un estrazione netta. Se l'estrazione è elevata e non si hanno alti volumi, si ha un'escrezione maggiore per relativo basso riassorbimento rispetto al carico.

Quindi bisogna tenere presente due fasi, una di secrezione e l'altra di escrezione che è funzione del carico e del flusso tubulare: in presenza di alto flusso tubulare, il meccanismo della secrezione dà un'estrazione, per cui il bilancio può diventare negativo.

Questo è importante perché se avete un'ipopotassiemia e cercate di correggerla mantenendo alti i volumi di filtrato, rischiate di perdere potassio anziché di guadagnarlo, è il meccanismo della potassiuria in presenza di alto filtrato o di alto flusso tubulare. Se voi avete un diuretico, molto probabilmente il potassio scenderà perché viene in parte non riassorbito, ma in buona parte non secreto.

In più c'è un secondo aspetto da tenere presente nell'insufficienza renale, sia acuta che cronica: si determinano le condizioni per una grave **acidosi metabolica** per ritenzione di sostanze acide.

In presenza di acidosi, si ha un secondo componente all'**iperpotassiemia**: non solo l'azione del filtrato, ma anche uno shift dall'interno all'esterno delle cellule del potassio. Quindi un meccanismo non renale, ma un passaggio dal LIC al LEC (Liquido IntraCellulare e Liquido ExtraCellulare, NdR). Viceversa in una condizione di alcalosi, si ha molto spesso un ipopotassiemia.

Il potassio inoltre è molto sensibile in questo shift all'azione dell'insulina e agli stimolanti β-adrenergici; queste condizioni determinano il passaggio dall'esterno all'interno della cellula. Quindi insulina, adrenalina e aldosterone nel tubulo determinano un flusso di potassio:

- alta insulina=ipopotassiemia; se avete il **diabete** avrete tendenzialmente **iperpotassiemia**;

- molto aldosterone significa ipopotassiemia per escrezione renale perché vengono riattivati i trasporti e per lo shift intracellulare; **basso aldosterone iperpotassiemia** sempre anche perché c'è perdita di sodio e quindi di volume;

- adrenalina=ipopotassiemia.

Nell'acidosi si determinano le condizioni che portano all'estrusione del potassio dalle cellule, quindi nell'insufficienza renale avrete un'iperpotassiemia dovuta alla bassa escrezione e secrezione, ma anche da uno shift dalle cellule all'esterno. Quindi è una condizione estremamente pericolosa e che porta rapidamente a morte nel caso di insufficienza renale.

Vi dicevo che nell'insufficienza renale c'è tipicamente un'i**pocalcemia**: il riassorbimento del calcio segue un andamento similare a quello di molti altri elettroliti con elevato riassorbimento prossimale, poi uno nel tratto distale che è PTH-dipendente, attraverso l'espressione di canali apicali del calcio.

Nell'insufficienza renale si osserva ipocalcemia perché c'è un'alterata capacità di riassorbimento da parte del PTH. Questo perché i reni sono gli organi dell'attivazione della vitamina D nella forma diidrossilata (1,25(OH)2 vitamina D). In mancanza di questa la capacità di assorbimento intestinale del calcio si riduce, la calcemia tende a scendere e -pur in presenza di elevati livelli di PTH- la capacità di riassorbimento del calcio nel tubulo di distale è ridotta a causa dell'insufficienza renale, per cui contemporaneamente si avrà ipocalcemia e iperfosfatemia. L'iperfosfatemia è stata chiamata in causa come uno dei meccanismi che fanno progredire il danno endoteliale della malattia vascolare e che, in presenza di alterazioni del metabolismo, favorisce lo sviluppo di aterosclerosi accelerata in caso di insufficienza renale.

EQUILIBRIO ACIDO-BASE:

Dal punto di vista della fisiopatologia clinica, l'equilibrio acido-base è molto rilevante: non perché sia una condizione che di per sé determini una malattia (è raro che ci sia un disturbo primitivo), ma è frequente riscontrarne un'alterazione secondaria ad un'altra patologia.

È il caso dell'insufficienza renale, in cui si ha ritenzione di sostanze acide che normalmente verrebbero escrete dal rene e questo determina una modificazione del pH verso l'acidosi.

In realtà abbiamo visto anche un'altra condizione in cui è prevedibile una alterazione del pH e dell'equilibrio acido-base perché si ha un'incapacità di eliminare l'anidride carbonica, che è in equilibrio con l'acido carbonico (*acidosi respiratoria NdR*).

In realtà, tutto il metabolismo dell'organismo tendenzialmente porta ad una condizione di acidosi: se voi avete una nutrizione che è basata unicamente su zucchero, come prodotti finali avrete acqua e CO2, da cui l'acido carbonico; tuttavia in condizioni di metabolismo alterato da deficit di ingresso di glucosio (ad esempio nel diabete), dove prevale l'utilizzo di acidi grassi nella catena di generazione dell'ATP e in cui il ciclo di Krebs non è funzionante con un'utilizzazione incompleta degli acidi grassi, che non entrano nel ciclo dell'acido piruvico e non c'è una completa demolizione, si possono accumulare dei chetoacidi (acido acetacetico e acido beta idrossi-butirrico, insieme all'acetone che però non è un acido, ma un chetone).

La stessa cosa può capitare nel digiuno protratto oltre le 24 ore, che determina un deficit di utilizzazione del glucosio e un prevalente utilizzo degli acidi grassi a scopo energetico e quindi formazione di chetoacidi.

In condizioni di ipossiemia, come in uno sforzo protratto o di scompenso cardiaco, in cui il cuore e i muscoli lavorano in una condizione di ipossia tissutale, si ha un catabolismo del glucosio con produzione di acido lattico.

Nella fisiologia e nella patologia sono molte le situazioni che possono portare alla formazione di acidi. La quantità di acidi che si formano nell'organismo sono ben compensati dalla capacità dell'organismo di eliminarli. Ovviamente,se abbiamo un accumulo di acido, abbiamo una tendenza allo sviluppo di acidosi, con un accumulo di protoni nell'ambiente intra- ed extracellulare.

Il sistema funziona perché c'è un sostanziale equilibrio tra formazione ed eliminazione, ma è anche mantenuto stabile dai sistemi tamponi, che hanno la capacità di attenuare le variazioni del pH attraverso una variazione della disponibilità di protoni. Se questi vengono rimossi perché vengono coniugati ad altre strutture molecolari, si determina una attenuazione della variazione di concentrazione degli idrogenioni.

RIMOZIONE DEI PROTONI:

La rimozione avviene attraverso due vie principali: il rene e i polmoni.

Polmoni: nel sistema extracellulare, cioè nel LEC (interstiziale e intravascolare), il principale sistema tampone è quello del bicarbonato, dato dall'equilibrio nell'organismo tra acido carbonico in forma dissociata e in forma indissociata, cioè tra un sale (per lo più con sodio nel compartimento extracellulare) e acido carbonico. Quindi il sistema tampone funziona perché ha una Kd (costante di

dissociazione) prossima al pH fisiologico e perché nella forma salificata è in grado di accettare ioni idrogeno e la forma indissociata di essere in equilibrio con la CO_2, che può essere eliminata per via respiratoria. Quindi si forma CO_2 nell'organismo e una quota di questa viene trasformata con un'attività enzimatica e uno spostamento della reazione verso i prodotti, quindi verso la produzione di acido carbonico, che si dissocia nell'ambiente idrosalino del LEC in bicarbonato. Il bicarbonato è poi in grado di accettare idrogenioni, riformando acido carbonico, che essendo in equilibrio con la CO_2, può essere poi eliminato attraverso l'attività respiratoria.

La CO_2 è presente in quantitativo relativamente elevato rispetto alla quantità atmosferica e quindi la capacità di eliminazione da parte dei polmoni è molto elevata, perché il differenziale di concentrazione è alto tra ambiente alveolare e atmosfera (tra ambiente alveolare e sangue invece è abbastanza ridotto). Questo chiaramente salvo che non ci siano ostacoli all'eliminazione dei gas nelle vie aeree o un disturbo dei setti per cui lo scambio viene ridotto, che causano l'impossibilità di eliminare la CO_2 nell'ambiente. Dunque se l'attività respiratoria è efficiente, si riesce a mantenere l'equilibrio nel tempo.

Rene: Il secondo meccanismo attraverso il quale il meccanismo mantiene costante il pH è la capacità del rene di eliminare gli acidi titolabili, cioè quelle sostanze a valenza acida (solfati, fosfati) che derivano dal metabolismo degli aminoacidi principalmente. Il rene :

è l'unico organo in grado di eliminare questo tipo di acidi, la cui produzione è relativamente piccola rispetto alla quantità di CO_2 che si genera nell'organismo e che è proporzionale alle moli di sostanze elementari che vengono metabolizzate dalle cellule. Di solito gli acidi titolabili non superano le 70 mmol/die contro i 20.000 mmol/die della CO_2. Questa capacità però è solo del rene funzionante, mentre il rene insufficiente non ha la possibilità di eliminare gli acidi organi.

- · RECUPERO DEL BICARNATO: la CO_2 viene prodotta all'interno delle cellule, va nei globuli rossi, dov'è presente l'anidrasi carbonica (non è l'unica sede in cui la si trova, ma qui la sua attività è particolarmente evidente) che forma acido carbonico, che è in equilibrio con lo ione bicarbonato.

A livello renale c'è un importante funzione: il rene è deputato al recupero del bicarbonato. Essendo infatti un composto ultrafiltrabile, se non fosse recuperato dal tubulo, si avrebbe un deficit netto di bicarbonato determinato dalla perdita renale; quindi è fondamentale che quasi tutto il bicarbonato che viene filtrato venga recuperato.

Non solo, ma la capacità del tubulo è anche quella di scambiare ioni idrogeno, di modo da poter recuperare l'acido carbonico come CO_2 ed eliminare gli acidi in forma organica attraverso un sistema di tampone accessorio che è quello dei fosfati e degli ioni ammonio.

Il glomerulo filtra tutto il bicarbonato, quindi essendo la concentrazione di questo ione 22 mol/L e il volume di ultrafiltrato 180L/die avreste perso al giorno il prodotto di questi due fattori, quindi il tubulo deve riassorbire con elevatissima efficienza.

Il bicarbonato è dissociabile in acqua e anidride carbonica, che è retrodiffusibile, per cui può essere recuperata insieme all'acqua. Sulla superficie luminale delle cellule tubulari è espressa un'isoforma dell'**anidrasi carbonica** che determina dissociazione in CO_2 e acqua dell'acido carbonico e quindi facile recupero dell'anidride carbonica attraverso le membrane e dell'acqua che segue i soluti. All'interno della cellula tubulare, un'altra anidrasi carbonica riforma l'acido carbonico che può

essere scambiato con un sistema di trasporto un po' complesso e diversamente espresso nei diversi tipi cellulari del tubulo (uno tipico è quello del cotrasporto Na^+/HCO_3^- scambiato contro il K^+). Nel tubulo prossimale, c'è uno scambiatore Na^+/H^+, per cui il sale può essere riassorbito, eliminato come acido carbonico e riassorbito come CO_2. Quindi il risultato netto è che quando riassorbo sodio nel tubulo prossimale del rene, assorbo anche acqua, estrudo ioni idrogeno, posso riassorbire il bicarbonato di sodio come CO_2, che retro diffonde in quanto liposolubile, poi viene spinta da capo nell'interstizio e nei vasi, grazie all'attività di cotrasporto espresso sul versante abluminale della cellula.

Questo è il recupero dei bicarbonati che avviene per grandissima parte nel tubulo prossimale. Richiede la presenza di anidrasi carbonica per accelerare la dissociazione e riassociazione della CO_2 in acido.

- · RIGENERAZIONE DEI BICARBONATI: la cosiddetta rigenerazione dei bicarbonati avviene tramite la formazione ex novo di acido carbonico e pesa meno quantitativamente di quanto non faccia il meccanismo di recupero, però è attivata in condizioni particolari come l'acidosi. Questo è più tipico del tratto più distale del tubulo, richiede la cooperazione di più tipi cellulari ed è associato ad uno antiporto Cl^-/H^+. Il recupero del sodio permette poi la riformazione del sale bicarbonato di sodio.

Quindi da una parte c'è il recupero dall'altra la rigenerazione, che è simile a quella che avviene nel globulo rosso.

Nel dettaglio, la filtrazione porterebbe ad una perdita netta di un'enorme quantità di bicarbonato di sodio; il riassorbimento è prossimale per l'80%, poi quote minori (*vengono riassorbite nei tratti distali, NdR*); nelle urine ce ne sono 0,36 mmol/L.

Quindi il riassorbimento in condizioni fisiologiche è molto elevato e quasi completo, la quota escreta serve come meccanismo di tampone, però essendo possibile un meccanismo di scambio di idrogeno con gli acidi organici escreti con le urine, questi si caricano normalmente dello ione idrogeno e determinano urine acide, con possibilità di recupero elevato di bicarbonato. Dunque c'è uno scambio a livello tubulare tra acidi organici (solfati e fosfati soprattutto) e bicarbonati nel fare da trasportatori verso l'esterno degli ioni idrogeno.

Appare evidente che se io ho un danno tubulare potrei perdere bicarbonati, ad esempio se ho un danno organico; ci sono molte forme congenite di acidosi tubulare che sono proprio caratterizzate da un incompleto recupero del bicarbonato oppure è incompleta la rigenerazione: nelle urine compare bicarbonato in alta quantità e nel sangue si determina una bassa concentrazione di bicarbonato con acidosi.

AMMONIOGENESI:

C'è un meccanismo aggiuntivo che determina la capacità di eliminare attraverso le vie urinarie acidi in quantità maggiore rispetto a quello che potrebbe essere dato dalla semplice eliminazione degli acidi organici ed è l'**ammoniogenesi**. È un <u>processo che viene modulato nel tubulo prossimale e richiede un'attività enzimatica specifica per ottenere dalla glutammina la formazione dello ione ammonio.</u>

È un meccanismo regolato anche, tra dei vari fattori, dallo stato di acidosi, durante cui l'ammoniogenesi viene spinta. Si formano, con questo meccanismo intratubulare, con estrusione nel lume del tubulo di ione ammonio, circa 40 mmol/die di ammoniaca. L'ammoniaca può veicolare, diventando ione ammonio quaternario, quattro H+, quindi si carica di un eccesso di acidi, quindi serve a favorire il mantenimento del pH attraverso una maggiore escrezione urinario di acidi, con contemporaneo recupero di bicarbonato ovviamente. È un sistema inducibile dall'acidosi per eliminare una maggiore quota di ione idrogeno, attraverso un meccanismo enzimaticamente determinato che genera ammoniaca localmente, che va a finire, essendo secreta nel tubulo, nelle urine. Elimina una quantità di ioni idrogeno molto elevata.

Tornando allo schema generale: il polmone elimina la CO_2 con la respirazione; fosfati, solfati e ammoniaca eliminano la quota di acidi organici non altrimenti eliminabili, che si accumula nell'organismo.

Quindi nell'insufficienza renale, un po' perché si danneggia la capacità di generare ioni ammonio e un po' perché si perde il filtrato e il recupero di bicarbonati, determina necessariamente un'acidosi, che nelle forme gravi è causata da accumulo di sostanze organiche acide, più che da perdita di bicarbonato.

RESPIRO DI KUSSMAUL:

C'è un secondo meccanismo adattativo molto importante che fa sì che in condizioni di acidosi si possano eliminare più acidi: i chemocettori centrali sono sensibili agli H+, quindi ogni condizione di acidosi determina uno stimolo per la respirazione.

Se c'è una condizione di questo tipo, accade che con acidosi comunque determinata (da diabete, da insufficienza renale, da dispersione di bicarbonati a livello intestinale…) aumenta l'attività respiratoria, che elimina una quantità maggiore del normale di acido carbonico e quindi si ha un effetto di depauperazione del sistema tampone nella sua quota acida. Ovviamente questo ridurrà anche la capacità complessiva del tampone, ma renderà meno carico di H+ il LEC.

Quindi tutte le volte che si ha acidosi, si ha un aumento considerevole della profondità, dell'ampiezza e del numero degli atti respiratori, il cosiddetto **respiro di Kussmaul**.

È un meccanismo compensatorio. Lo stesso che si instaura nell'acidosi respiratoria, solo che in quel caso determina dispnea perché la funzione polmonare è alterata e così la possibilità di eliminare CO_2. Quindi la **polipnea** (= aumento dell'ampiezza e del numero degli atti respiratori) è comunque espressione di acidosi, indipendentemente dal fatto che ci sia un problema respiratorio. Se un paziente respira molto affannosamente non è detto che abbia una patologia respiratoria, potrebbe anche trattarsi di una condizione di acidosi che viene contenuta da una buona funzionalità polmonare, che limita l'incremento di H+.

Sistema tampone degli eritrociti: se io blocco l'attività dell'anidrasi carbonica, ho una condizione di acidosi. Ci sono dei farmaci che si usano in alcune condizioni per stimolare il centro respiratorio

che proprio bloccano questo enzima, favorendo una condizione di acidosi; si usano ad esempio con tendenza all'alcalosi.

ACIDOSI:

Quindi il livello di bicarbonato nel sangue rimane molto costante. Se però ho uno squilibrio nell'equilibrio acido-base questo non è più vero e il livello del bicarbonato tende a modificarsi.

La prima condizione in cui avviene questo abbassamento è l'**acidosi da acidi organici**, che si verifica ad esempio con:

- accelerazione intensa della capacità fisica, protratta oltre la capacità di lavoro aerobico del muscolo oppure uno scompensato dopo poco che fa esercizio anche a riposo oppure in presenza di un disturbo della catena mitocondriale per tossicità o per motivi genetici (acidosi lattica).

- Produzione di chetoni nel diabete (*chetoacidosi diabetica NdR*)

- Iperpiressia che aumenta il catabolismo cellulare e così via.

Avrò che l'acido reagisce con gli ioni idrogeno, si forma un acido organico, che viene tamponato dal bicarbonato, che però viene consumato perché si ridurrà il numero di ione bicarbonato e si avrà una contemporanea maggiore eliminazione di CO2 per via respiratoria.

Quindi tutte le volte che c'è acidosi organica, è prevedibile anche sulla base delle reazioni chimiche che il bicarbonato venga consumato e il meccanismo di compenso respiratorio determina una perdita di CO2 per cui tutto il sistema tampone viene consumato.

Il pH, dopo una fase di relativa stabilità finché il sistema tampone riesce a compensare la generazione di acido in eccesso, comincerà a scendere; ovviamente la discesa del pH non andrà al di sotto del 7, perché l'ampiezza dei valori di pH entro i quali si muove la fisiologia della cellula e dell'organismo è 7.40+/-0.05, oltre si ha già una tendenza all'acidosi e all'alcalosi; il limite estremo è difficilmente determinabile, perché dipende molto dalle velocità con cui si verifica la variazione, indicativamente sotto il 7.20 si ha grave acidosi e in condizioni gravissime come un arresto cardiocircolatorio il pH è di 7.12/7.15, al di sotto c'è la morte dell'organismo. Per acidosi si intende una discesa al di sotto della soglia di 7.35.

La rigenerazione renale di bicarbonato si accelererà come aumenta l'attività respiratoria.

Una volta che tende a consumarsi il sistema tampone, il bicarbonato si riduce e l'acidosi diventa molto grave al di sotto di 10 mmol/L di bicarbonato nel sangue.

Nell'insufficienza renale c'è da una parte l'accumulo di sostanze acide titolabili (fosfati, solfati), ma anche spesso un difetto tubulare associato, per cui la tendenza all'acidosi è più rapida, perché contemporaneamente si ha un maggior difetto di bicarbonato.

Vi ho aggiunto qui una formuletta promemoria per un calcolo pratico (non è un calcolo matematico, le unità di misura sono diverse!!!): la paCO2 in mmHg corrisponde in condizioni fisiologiche più o meno alla concentrazioni in mmol di HCO3- + 15 (calcolo fatto solo a fini pratici perché hanno i due valori hanno unità di misura diverse).

ES. Se sappiamo che la concentrazione di HCO_3^- plasmatica è di 24 mmol/L, allora il calcolo sarà:

<u>[HCO3-]+15 mmol/L = Pco2</u>

24+15=39 ≈ 40 mmHg (che è la Pco2 nel sangue arterioso)

-

<u>Malattie interstiziali polmonari o insufficienza respiratoria di tipo ostruttivo</u> con accumulo di CO_2 causano un accumulo di acido carbonico e quindi del bicarbonato, quindi un **acidosi di tipo respiratorio**. A questa condizione si può applicare la formuletta citata sopra.

ES. Se la Pco2 arriva a valori di 65-70 mmHg , applicando la formuletta inversa avrò:

<u>Pco2-15 mmol/L = [HCO3-]</u>

65-15=50 mmol/L di HCO_3^-

Tuttavia, nel caso di patologia cronica, non arriverò mai a valori di 50 mmol/L di HCO_3^-, ma bensì si rileveranno per lo più valori attorno ai 40 mmol/L di HCO_3^-. Pertanto, in questi casi, la formula va corretta, poichè l'aumento dei bicarbonati, oltre una certa soglia, non è più lineare; dunque, i livelli di pCO_2 non correlano linearmente con quelli dei bicarbonati sopra un certo valore di questi ultimi, poichè ci sono dei correttivi che impediscono che questo avvenga.

Quindi l'acidosi respiratoria con una formuletta più pratica: per ogni +10 di pCO_2 ho un +1 di acido carbonico nella fase acuta.

ES. Se normalmente la Pco2 è di circa 40 mmHg (calcolata con la formuletta precedente) e in un'acidosi respiratoria acuta ho una Pco2 di 70 mmHg, avrò:

70-40=30 mmHg in più di Pco2

Se per ogni +10 mmHg di Pco2 ho un +1 di mmol/L di HCO_3^-, le mmol di HCO_3^- in più saranno 3 (30 mmHg/10 mmHg) e quindi la concentrazione plasmatica di HCO_3^- salirà da 24 mmol/L a 27 mmol/L (24+3).

Al contrario nell'insufficienza cronica, poiché per ogni +10 mmHg di Pco2 le mmol/L di HCO_3^- aumentano di 4 volte, avrò:

3*4 mmol/L= 12 mmol/L di HCO_3^- in più e, dunque, una concentrazione plasmatica di 36 mmol/L di HCO_3^- (24+12).

Nell’insufficienza cronica la correzione è parziale, non ho quel calcolo della fisiologia. Dunque la correzione, in termini di incremento di bicarbonato, non segue i valori di CO_2 in modo sempre lineare, ma dopo una certa concentrazione tende ad appiattirsi.

Inoltre, essendo la formazione di acido carbonico e di bicarbonato dipendente dall’attività enzimatica dell’anidrasi carbonica, è temporalmente un po’ dissociato dalla formazione di CO_2; per cui l’acidosi si forma e si corregge dopo la variazione di pCO_2. Questa latenza nella correzione del bicarbonato vale anche nelle acidosi metaboliche da acidi organici.

Questo è da tenere conto nella correzione di uno stato di acidosi, che non dovrà avvenire rapidamente: ad esempio, una chetoacidosi da insufficienza di insulina può essere corretta da una somministrazione di insulina, poiché le cellule riprendono l’assunzione di glucosio; la correzione però è temporalmente ritardata rispetto all’utilizzo del glucosio, per cui si generano degli squilibri temporali che possono determinare variazioni che persistono verso il basso del bicarbonato e perdita degli acidi. Quindi, paradossalmente, correggendo rapidamente una chetoacidosi in modo efficiente, avrete bassi bicarbonati, ma senza acidi: il risultato è un’alcalosi.

Tenete presente questa dissociazione perché la stessa cosa avviene per l’acidosi respiratoria: in una gravissima acidosi da arresto respiratorio, se riprendete la respirazione rapidamente e in modo assistito, la CO_2 viene eliminata, però l’eccesso di acido carbonico e di bicarbonato permane e quindi avete un abbassamento improvviso della CO_2, con persistenza di un’acidosi di tipo metabolico perché il bicarbonato rimane alto.

Quindi avete delle transitorie dissociazioni nel sistema tampone, quando ci sono delle correzioni molto brusche della generazione di acidi o di CO_2. Ciò accade frequentemente.

Pensate allo scompenso cardiaco: c’è acido lattico, però c’è anche una bassa ossigenazione dei tessuti, cioè una relativa ipossia, con tendenza ad avere un po’ più CO_2 elevata, perché il sistema circolatorio non permette uno scambio adeguato a livello polmonare; il risultato è che avete un acidosi di tipo misto.

Per riassumere: nell’acidosi respiratoria, si ha accumulo di CO_2 e compenso renale poco funzionante; nell’acidosi di tipo metabolico, bassa eliminazione di H^+ oppure perdita di bicarbonato. Nell’acidosi c’è sempre attività respiratoria spinta, un compenso metabolico renale e in più, spesso, determina le condizioni che promuovono il vomito, per perdere acido cloridrico con il succo gastrico.

ALCALOSI:

L’alcalosi è l’eccesso opposto: deficit di H^+ o eccessiva perdita di CO_2, con genesi di tipo **metabolico** (un diuretico che fa perdere molti acidi o assunzione di molto bicarbonato) o di tipo **respiratorio** (in alta montagna, stati ansiosi o di paura, lesione cranica da trauma con attività respiratoria incontrollata). Si ha una variazione del pH verso l’alto, che è compensata dal sistema tampone bicarbonato.

Tuttavia, entrambe le alcalosi non sono di facile compenso; per fortuna, al contrario dell'acidosi che è comunissima (basta un digiuno di 24 h), l'alcalosi non è di frequente riscontro (iperaldosteronismo, intossicazione da bicarbonato, sondini naso-gastrici che portano via acido).

Per compensare un'alcalosi metabolica dovrei smettere di respirare, ma ciò è chiaramente un sistema esauribile (non appena diminuisce l'ossigeno, automaticamente rinizio a respirare), quindi il compenso sarà modesto. L'alcalosi di tipo respiratorio tende ad avere un arresto nel fatto stesso che determina iperossigenazione, per cui si va in apnea. Però ci sono alcune condizioni (alta quota, trauma cranico) in cui l'arresto respiratorio non avviene: nel primo caso perché l'ossigeno nel sangue non raggiunge mai la concentrazione necessaria a spegnere il meccanismo, nel secondo perché c'è un alterato controllo centrale. Quindi tenete presente che anche questa ha in sé come compenso una modificazione dell'attività respiratoria. Il rene infatti, più che eliminare più bicarbonato, non può fare, ma questa capacità è comunque contenuta perché la maggior parte del riassorbimento è obbligatorio. Quindi anche qui i meccanismi dell'alcalosi sono assai molto scadenti.

(NdR: il professore avverte che l'alcalosi va studiata principalmente da soli in quanto non c'è tempo e dovrebbero essere argomenti di fisiologia e non di fisiopatologia clinica).

Lezione di Patologia generale e fisiopatologia clinica (sem2) del 13/5/2013 (1)

Sbobinatore: Chiara Simonetto

Revisore: Giulia De Cao

Patologia 13-05-13 , prof. Sorio

CANCEROGENESI FISICA E CHIMICA

(*non si dispone ancora di slide, all'inizio la registrazione è un po' disturbata)*

-

CANCEROGENESI FISICA

Definizione cancerogenesi fisica: riguarda tutte le variazioni sia elettromagnetiche che corpuscolate, le alte e basse temperature, i materiali meccanici, solidi e i gel. Piu' in generale comprende tutti quei materiali che siano insolubili o molto poco solubili in acqua (che non compiano quindi un'azione biochimica) e siano potenzialmente in grado di indurre trasformazione neoplastica nei modelli animali, e nell'uomo in prospettiva.

La cancerogenesi fisica si occupa di identificare tutti quegli agenti che possano causare cancro mediante le loro caratteristiche fisiche piuttosto che quelle chimiche proprio perché sono materiali insolubili incapaci di compiere un effetto attraverso una via chimica. In questa categoria vengono inclusi sia materiali duri che soffici, particelle di tipo fibroso e non fibroso, materiali in forma di gel. Esempi di questi cancerogeni sono: le fibre come l'asbesto (cancro polmonare e mesotelioma), materiali fibrosi non particolati come il nichel e il cobalto in forma polverizzata, la silice cristallina, gel in silicone (delle prime protesi mammarie).

Questi materiali sono stati scoperti grazie ad impianto nei topi (anche materiali nobili e inerti dal punto di vista chimico come l'oro, che non dovrebbero interagire con strutture biologiche, sono responsabili di indurre trasformazione neoplastica). Vi è anche una "teoria sulle forme", secondo la quale forme appuntite causerebbero più trasformazione di forme arrotondate: il che si traduce nell' effetto della meccano-trasduzione, ossia le risposte biochimiche scaturite a seguito di stimoli di tipo meccanico.

MECCANISMO D'AZIONE dei cancerogeni fisici

Per esser considerati cancerogeni fisici i materiali dovrebbero indurre trasformazione (cancro) secondo meccanismi di tipo fisico. Però meccanismi ad esempio di tipo irritativo o meccanismi fisici che interagiscano con recettori di natura indeterminata sulla superficie cellulare inducono una trasduzione del segnale che si traduce in una reazione di tipo chimico (*posizione personale del prof: i due meccanismi non sono dunque indipendenti)*. Comunque sia è difficile studiare i meccanismi di trasduzione per questi materiali. (come si fa a trovare un recettore che leghi l'oro?non esiste. Sicuramente sono coinvolte risposte cellulari che ancora non sono note)

1. ONDE ELETTROMAGNETICHE

Lo spettro d'onda è in relazione con la frequenza e l' energia, che sono inversamente proporzionali tra loro ossia più bassa è la frequenza più alta è l'energia che viene trasportata. Esempi sono le onde elettromagnetiche sulle linee ad alta tensione, le onde radio, i microonde, le persone stesse (che producono campi elettromagnetici) , lo spettro del visibile, infrarosso e ultravioletto, le radiazioni a bassa lunghezza d'onda (x-rays ed elementi radioattivi). Il fatto che i campi elettromagnetici possano causare cancro è un elemento molto dibattuto (es. radio vaticana che si riteneva essere un potenziale "pericolo" con le proprie onde). Inoltre anche gli studi sono molto complessi perché ci possono esser variazioni del 9-10% sull'incidenza di tumori nella popolazione, e per questi studi necessitiamo di una popolazione molto ampia di soggetti che lavorino ad esempio nel campo delle aziende elettriche, esposti ad almeno 10 microtesla all'anno (basti pensare che il tipico background da campo magnetico domestico è di 0,001 microtesla e quello creato dal nostro cervello è di

2. TRAUMI E RIPARAZIONE DEI TESSUTI

Anche se non vi sono dati sperimentali che colleghino i traumi ai tessuti con i tumori, vi sono evidenze di un effetto promovente dei primi, ad esempio gli effetti della flogosi cronica con produzione dei ROS da parte dei fagociti fanno presupporre un collegamento tra il danno ossidativo a macromolecole biologiche tipo il DNA e l'eccessiva produzione di ROS.

3. CANCEROGENESI DA RADIAZIONE

Radiazioni: sono forme di energia che si trasmettono sottoforma di onde o particelle. Nel caso delle onde elettromagnetiche o fotoni la velocità è pari a quella della luce, nel caso di atomi o costituenti dei nuclei (particelle) la velocità è più bassa di quella della luce. Genericamente, sono forme di energia che vengono veicolate a distanza e che quando colpiscono possono interagire con la materia scaricando la loro energia e modificando gli equilibri biochimici (ad esempio viene strappato un elettrone o cambia la sua valenza).

(slide sulle onde elettromagnetiche) ci focalizziamo su quelle a minor lunghezza d'onda e a più alta energia: UV, raggi x e gamma. All'interno del campo del visibile, sappiamo di esser esposti alle radiazioni UV (che hanno effetti nocivi) e che noi non vediamo. Esse sono suddivise in 4 categorie, di cui 3 ci riguardano sulla superficie terrestre: UVA, UVC, UVB. Gli UVA hanno lunghezza d'onda di 320-400 nm, gli UVC 260 nm e gli UVB 280 nm. L'esposizione a queste ultime due è la più pericolosa perché il DNA e le proteine del nostro organismo hanno proprio picchi di assorbimento a 280 (proteine) e 260 (DNA) nm. Gli UVC nel nostro pianeta sono schermati dallo strato di ozono, che manca solo a livello dei poli (buco dell'ozono).

EFFETTI SULLA MATERIA DELLE RADIAZIONI

Dipendono dall'energia che arriva, per cui avremo al di sotto di una soglia di 1 eV un effetto termico (con oscillazioni e fluttuazioni atomiche ma non rottura di legame), da 1 a 10 eV un effetto eccitante (con innesco di reazioni chimiche ossia la cosiddetta fotoattivazione che viene anche sfruttata in terapia), e se superiore ai 10 eV si dice effetto ionizzante (ossia in grado di spostare le orbite degli elettroni e quindi causare delle alterazioni più significative delle alterazioni chimiche)

Quali sono le RADIAZIONI ECCITANTI:

La luce solare, che non rompe i legami chimici , e di cui fanno parte UVB e UVC (che colpiscono e interagiscono come precedentemente detto con DNA e proteine trasmettendone la propria energia, possono causare ustioni). La luce solare si divide in: raggi infrarossi, che determinano la tipica sensazione di calore quando siamo esposti alla luce solare (sono il 55% della luce solare), luce visibile (il 40% della luce solare, rappresenta il tipico arcobaleno che possiamo vedere) e una piccola percentuale di UVA e UVB (5% che possono causare gravi ustioni).

E' necessario poi sottolineare che l'effetto delle radiazioni non è solamente acuto, ma può essere anche cronico. Esse possono infatti indurre effetti a lungo termine come l'incidenza di neoplasie a livello dei siti corporei colpiti (gli UVB ricordiamo vengono schermati dalla melanina prodotta dai melanociti, ma l'esposizione può raggiungere una quota non assorbibile e a questo punto vengono colpite le cellule staminali dello strato basale, determinando un danno perenne con alterazione del patrimonio genetico ed eventuale trasformazione neoplastica). Quindi ricapitolando, non solo danno acuto per necrosi o apoptosi delle cellule colpite, ma anche meccanismi di DNA repair che col tempo, se la cellula è sottoposta a continua esposizione (es- marinai), possono fallire e si instaura trasformazione neoplastica. Un altro effetto delle radiazioni, nelle aree altamente inquinate, è legato alla presenza di idrocarburi e ad altri prodotti della combustione come il perossiacetilnitrato (il cosiddetto PAN), che sono molto

reattivi e possono causare irritazione agli occhi e alle vie aeree (questi sono indotti dalla reazione tra sole e prodotti della combustione e possono causare morte di pazienti con patologie polmonari precedenti, come la fibrosi cistica o l'insufficienza respiratoria cronica, che determinano quindi una situazione polmonare già parzialmente compromessa).

4.MATERIALI
RADIOATTIVI

L'emivita di un materiale radioattivo rappresenta il tempo impiegato dalla metà di questo campione radioattivo a decadere, e l'emivita è una caratteristica intrinseca e fisica (non chimica) di quello specifico materiale.

(*vedere bene slide con tabella periodica degli elementi*) dove sono evidenziati bene gli elementi stabili e quelli radioattivi, tra cui alcuni prodotti in laboratorio a brevissima emivita e quelli che invece rimangono nell'ambiente per ere geologiche (es. Torio ha un dimezzamento di 4-5 miliardi di anni).

CONCETTO DI LET (LINEAR ENERGY
TRANSFER)

Questo concetto è alla base della radioprotezione, a noi non basta sapere quanta energia ha la particella che colpisce il materiale biologico ma la sua capacità di trasmettere energia lungo il suo percorso. Particelle ad alta energia ma basso LET sono paradossalmente meno pericolose di particelle a bassa energia ed alto LET, perché l'importante è quanta energia trasmettono. Ad esempio i raggi gamma e i raggi x attraversano le persone e solo una bassissima quota (5% *ma è un valore a caso del prof*) rimane "addosso" alla persona, hanno dunque un basso LET e sono meno pericolose. Particelle più grandi come protoni, le particelle alpha (nuclei d'elio) e gli elettroni invece quando ci colpiscono vengono "scaricate tutte addosso in pochi cm di percorso" (*ndr*) e sono estremamente produttive di ROS e danni biologici (le particelle non escono più).

Il prof fa poi un esempio su particelle gamma ed alpha concludendo che: a parità di energia di particelle gamma ed alpha ingoiate, l'alpha è miliardi di volte più pericolosa della gamma (attenzione: solo se ingerite), mentre se noi teniamo in tasca una particella alpha il danno è limitatissimo, mentre se teniamo una gamma in tasca, che abbia anche bassissimi livelli di interazione, è un qualcosa che continua a colpire ad altissima energia tutto il corpo per cui il problema non è più locale ma generale.

Dalle precedenti riflessioni, ricaviamo il concetto di EFFICACIA BIOLOGICA RELATIVA: essa è bassa per le radiazioni gamma, mentre anche 20 volte superiore per gli ioni pesanti. Va a misurare, a parità di energia, quali sono i danni biologici di un composto (ancora una volta, esser colpiti da radiazioni alpha, protoni e ioni pesanti è molto più pericoloso di esser colpiti da raggi gamma).

RADIAZIONI AMBIENTALI: esistono radiazioni provenienti dall'ambiente che ci circonda, e queste sono dell'ordine dei 125 millirem/anno, con variazioni in base all'ambiente che si considera (ad esempio zone ricche di radon creano problemi perché questo è un gas inalato che produce danni ai polmoni)

EFFETTI RADIAZIONI IONIZZANTI (cosa succede quando colpiscono
?)

- fase fisica: precocissima, con cessione di energia ed espulsione o spostamento di elettroni. La molecola cosi sbilanciata cerca altri elettroni per recuperare l'equilibrio e quindi si sposta nella zona attorno, cercando altre molecole da cui ricavarli (a meno che non trovi glutatione o altre sostanze cedenti e-) determinando una reazione a catena.

-fase chimica (la reazione a catena sopra citata)

-danno biologico: può esser diretto su macromolecole o indiretto per radiolisi dell'acqua (noi siamo costituiti per il 70% di acqua, per cui è più probabile il secondo, con conseguente produzione di radicali che vanno ad espandere il danno).

DANNO DA RADIAZIONI (vedere *schema riassuntivo sulla slide, il prof legge lo schema pari pari*)

TIPI DI DANNO

Il danno avviene a livello di tutte le macromolecole, le proteine hanno resistenza maggiore e richiedono dosi di radiazioni 10 volte maggiori rispetto al dna per esser alterate nella loro funzione, il danno del dna invece interviene a vari livelli (*prof dice di non voler entrare nel dettaglio di questi).* Meccanismi di riparazione del DNA sono molto importanti e alterazioni a livello di questi possono causare trasformazione neoplastica. Ad esempio lo Xeroderma Pigmentoso è associato al deficit enzimatico di uno dei meccanismi deputati alla riparazione del danno, con aumentato rischio di tumori alla pelle a seguito dell'esposizione a UV . Inoltre bisogna tenere in considerazione che nella popolazione è presente una variabilità del 5% per quanto riguarda la capacità di "excision repair" (da qui nasce il concetto di epidemiologia dei tumori) e che in alcuni soggetti con parenti di primo grado affetti da tumori vi è una diminuita capacità da parte dei leucociti di riparare addotti, ossia sostanze chimiche che si legano al DNA (amine aromatiche): la componente genetica dei tumori coinvolge quindi i meccanismi di riparazione del DNA.

MECCANISMI DI RIPARAZIONE DEL DNA

- meccanismo di riparazione diretto

- ner (nucleotide excision repair)

- ber (base excision repair)

- double strand
repair

- post replication
repair

- mismatch
repair

Complessivamente sono coinvolti più di 70
geni.

Esempio del funzionamento del NER: se vi sono mutazioni si ha alterazione della doppia catena, sono presenti delle molecole XPA e XPE che girano attorno alla catena come una rotellina e nel momento in cui trovano il mismatch si bloccano, segnalano il problema e determinano un'interazione con altre 9 proteine: la doppia catena viene svolta e aperta, con una molecola SSB che si inserisce in mezzo, viene tagliata via la zona comprendente l'alterazione e ricostruita con DNA polimerasi e DNA ligasi. Questo meccanismo è tarato per riparare il 99.9% dei danni fisiologici, ma se siamo soggetti a radiazioni o altri agenti questo meccanismo può non esser cosi efficiente.

(*prof mostra una tabella dove sono elencati valori delle dosi letali)* Per uccidere una persona sono necessarie dosi di 450.000 mrem (millirem), per indurre malattie da radiazioni dosi di 100.000 mrem. Tanto per dare un'idea in passato le televisioni a tubo catodico davano alte dose di radiazioni (erano acceleratori di elettroni) (0.2-1.5 mrem). Altri problemi sono dati dalle mammografie, e dai piloti di volo che hanno una certa dose annua di radiazioni (160 mrem). Anche gli astronauti sono sottoposti a radiazioni. Ciò che ci protegge da tutte le radiazioni cosmiche che altrimenti colpirebbero la terra con gravi effetti nocivi è il campo magnetico terrestre, deviando quasi tutte le particelle cariche.

-

-

CANCEROGENESI CHIMICA

Definizione di cancerogeno: è un agente che somministrato ad un animale non trattato induce per azione genotossica diretta un incremento significativo dell'incidenza delle neoplasie rispetto ai controlli, indipendentemente dal fatto che nella popolazione di riferimento vi sia un'alta o bassa incidenza di neoplasia.

Un concetto molto importante è che tutti i cancerogeni chimici si comportano da "tossici da sommazione", in quanto l'effetto avviene anche a distanza di tempo su somministrazione frazionate. La dose che induce un aumento statisticamente significativo di neoplasia è specifica per ogni composto, e viene detta "dose soglia", ma ciò non significa che sotto la dose soglia non vi sia effetto. L'effetto, anche se non si manifesta subito, può quindi esser visibile nel tempo per effetto di sommazioni ripetute anche di piccole dosi cancerogeno.

INIZIAZIONE E
PROMOZIONE

I concetti di iniziazione e promozione sono caratteristici sia dei cancerogeni fisici che di quelli chimici.

Per iniziazione si intende la comparsa di mutazioni nel genoma, che avviene a tutti i livelli ed è maggiormente misurabile rispetto al background fisiologico (ossia rispetto a quel numero di lesioni ossidative che avvengono ogni giorno fisiologicamente anche con la respirazione, che sono anche più di 10.000, anche se un soggetto ha uno stile di vita sanissimo: è una questione biologica). Superata la dose soglia si ha la comparsa del tumore. (Curiosità: l'unico agente chimico che sembra agire da solo mediante contatto , quindi iniziazione, senza una successiva promozione, è l'etil uretano puro. Gli altri composti chimici agiscono invece mediante un meccanismo misto di iniziazione-promozione)

La promozione è quella componente dell'azione della molecola che induce tumore in un organismo solo se questo è stato precedentemente trattato con dosi anche molto basse di una sostanza iniziante (cioè favoriscono l'amplificazione della popolazione mutata). I promotori da soli non hanno effetto, perché non riescono a indurre mutazione; essi inducono la proliferazione di una popolazione di cellule danneggiate: vengono anche chiamati "co-cancerogeni" proprio per sottolineare il fatto che da soli non causano cancro.

Quindi ricapitolando l'iniziazione è un processo rapido e addittivo ,causato da agenti chimici fisici e biologici, che danneggia il DNA inducendo mutazione, ma non stimola la proliferazione (anzi questa viene anche bloccata ad opera delle proteine come la p53 che captano il danno genomico e inducono arresto del ciclo cellulare). La cellula che ha queste mutazioni è morfologicamente indistinguibile dalle altre, ma a livello gnomico è diversa. La promozione invece è un evento lento, reversibile e non addittivo, dato da agenti che stimolano la proliferazione come gli esteri del forbolo contenuto all'interno dell' olio di croton, principio chimico irritante utilizzato in laboratorio come stimolante del metabolismo cellulare, grazie alla sua capacità di attivare la PKC. Altri promotori possono essere farmaci, ormoni, ferite, agenti irritanti, o anche una banale soluzione fisiologica nei bronchi iniziati.

PROGRESSIONE

Iniziazione e promozione da sole non spiegano l'insorgenza e l'alta percentuale di incidenza di neoplasia (circa 1/3, 2/3 sviluppano nella vita una qualche forma di neoplasia). Interviene quindi un altro meccanismo che è la progressione ossia l'attivazione dell'instabilità del genoma: vengono persi i meccanismi di riparazione del DNA con aumentata instabilità, indipendentemente dalla presenza dell'agente cancerogeno. La progressione è indipendente dall'iniziatore, nel senso che può avvenire anche decenni di anni dopo la mutazione iniziale (per alcune neoplasia quindi le tempistiche sono molto lunghe, basti pensare al tumore al colon, in cui si osserva la manifestazione della patologia 20-30 anni dopo l'azione del mutageno. Le leucemie hanno invece insorgenza più rapida). I promotori non inducono mutagenesi né cancerogenesi da soli, spesso agiscono senza attivazione metabolica e hanno la capacità di ridurre il periodo di latenza per la formazione del tumore dopo l'agente iniziante, aumentano la frequenza di tumori che si formano del tessuto bersaglio.

MECCANISMI D’AZIONE DEI
CANCEROGENI

I cancerogeni
determinano:

- cambiamenti della struttura del DNA (*prof dice che non entra nel dettaglio)*

- cambiamenti epigenetici: non riguardano la struttura, la sequenze del DNA ma la loro modificazione chimica (ad es. la metilazione delle citosine , che è un meccanismo di controllo della regolazione dell’espressione del DNA, grazie al quale i geni possono essere accesi o spenti)

DANNI DA
ROS

Sono provocati da cancerogeni chimici, così come da quelli fisici. Nel nostro organismo l’acqua è ubiquitaria e quindi mediatrice di danno se attivata, con formazione di addotti del DNA e modifica delle basi azotate (*prof dice di guardare la tabella per esempi di danni da ros:* perossidazione di lipidi in cicli catalitici; esposizione a perossidi; stimolo delle cellule a sintetizzare perossisomi se stimolate da farmaci, come gli ftalati o “endocrine disrupture” che sono plasticizzanti volatili che rendono la materia plastica flessibile; esposizione a esteri del forbolo che sono attivatori della proliferazione e induttori del metabolismo ossidativo della NADPH ossidasi, responsabile di meccanismi difensivi, che però produce ROS*)*

LA LESIONE AL DNA quando diventa
significativa?

- quando non viene
riparata

- quando è compatibile con la proliferazione cellulare, e la cellula non viene riparata ma la lesione causa morte cellulare (in questo caso la cellula non è più un problema “oncologico” ma diviene un problema per il tessuto, con perdita massiccia di cellule. Un esempio è la sterilizzazione del midollo osseo con azzeramento delle cellule staminali, si muore per danno multiorgano= failure che può essere dovuto ad intossicazione acuta da danni di chemioterapici nel tentativo di eliminare le cellule tumorali o a radiazioni).

(*vedere slide con esempi di come agiscono gli agenti inizianti e promoventi)* Se noi trattiamo una cellula sono con gli agenti inizianti, che comunque causano mutazione, non si osserva tumore, così come non si osserva se vengono utilizzati solo i promuoventi. Se invece accoppiamo iniziatori e tante volte i promoventi compare il tumore, l’agente iniziante ha mutato il DNA (da notare che servono 6 o 7 vie di mutazione per causare neoplasia) e il promovente ha poi indotto il tumore. Anche se trascorre del tempo (anche decenni) tra l’agente iniziante e quello promovente si osserva sviluppo di tumore.

Cancerogeno (potenziale: assorbito e metabolizzato dalla cellula, verrà attivato ed eliminato rendendolo ad esempio idrosolubile, eliminabile con le urine) - - - > cancerogeno prossimale - - - > cancerogeno terminale (va ad agire su RNA con errori di traduzione, su DNA con errori della trascrizione e su proteine) - - - > trasformazione maligna.

CENNI STORICI SULLA CANCEROGENESI CHIMICA

Il concetto di cancerogenesi chimica nasce intorno al 1775 con Sir Percival Polt che associa il tumore allo scroto alla fuliggine negli spazzacamini inglesi. Oltre a questo ha suggerito anche un protocollo antisepsi (con semplice lavaggio di mani per sterilizzarle, anche con soluzione di fenolo, per ridurre le infezioni). Altri esperimenti sono stati compiuti da americani (Kennaway, 1925) che effettuavano pennellamento di catrame sulle orecchie dei conigli e che già a quel tempo investigavano le origini virali del sarcoma di Rous (teoria virale del cancro).

CANCEROGENI CHIMICI (*vedere slide, non li elenca*)

I cancerogeni chimici sono classificati come naturali e artificiali, organici e inorganici, reattivi e inerti.Essi sono anche agenti mutageni, e sono molto diffusi, tanto che si effettuano test alimentari su varie sostanze per testare la loro capacità mutagena.

TEST DI AMES misura la capacità mutagenica delle sostanze su procarioti (che non hanno meccanismi di riparazione del DNA). Si pone in coltura la sostanza in analisi, ceppi di salmonelle mutanti incapaci di vivere in uno specifico terreno a meno che non abbiano una determinata mutazione (indotta eventualmente dal cancerogeno che si sta testando) e microsomi, ossia un estratto di fegato, che simulano il processamento epatico di una sostanza chimica e quindi la trasformazione da precancerogeno a cancerogeno terminale. La percentuale di batteri che cresce nel terreno di coltura , e che non crescerebbe se non fosse stata mutata, è direttamente proporzionale al potenziale mutageno del carcinogeno in questione (*slide mostra esattamente i passaggi*). In base al numero di colonie che si formano, si valuta la pericolosità della sostanza (se se ne formano tante, la sostanza è tanto mutagena). Il test viene effettuato in 48h e viene spesso applicato per cosmetici e sostanze alimentari.

I cancerogeni vanno ad agire sui legami chimici (in particolare sugli elettroni) formando addotti (composti di addizione). Esempi di cancerogeni chimici, oltre agli idrocarburi, sono le amine aromatiche, nitrosamine e aflatossina. Quest’ultima è un derivato di un fungo che cresce nel frumento, e viene comunemente assunto con l’alimentazione (pane, cereali, ecc.). L’aflatossina è un epossido che lega il DNA, che viene poi detossificato e riparato (grazie ai meccanismi di riparazione), ma se continuo l’assunzione di queste sostanze il rischio di mutazione aumenta. (NB. non esiste livello zero di aflatossina nel frumento in nord Europa, questa cresce bene in condizioni di umidità).

Come viene trasformato un precancerogeno in cancerogeno?

Attraverso la p450 (che media anche detossificazione e metabolizzazione dei farmaci):

Un esempio (?) è la p53 , un oncosoppressore che in condizioni normali induce arresto della crescita o apoptosi, in caso di danno e preserva la stabilità del genoma; se ho una lesione del DNA che colpisce anche la p53 si osserva perdita del controllo dell'arresto della crescita. Il DNA viene quindi riparato grossolanamente e si osserva instabilità genomica, con conseguente aumento della trasformazione neoplastica.

CANCEROGENI
EPIGENETICI

Non possiedono attività mutagena diretta e non possono essere scoperti con il test di Ames. Gli effetti dei cancerogeni epigenetici sono una citotossicità da danno tissutale cronico, formazione di metaboliti attivi e azione promovente delle cellule staminali tumorali. Degli esempi di questi cancerogeni sono sostanze come farmaci, asbesto, silicio, ormoni, immunosoppressori e la famosa tcdd (tetra-cloro-dibenzo-diossina, che negli anni '70 ha causato gravi problemi in seguito ad una esplosione).

(*elenca altre sostanze e associazioni con tumori specifici: vedere tabella non entra nel dettaglio)*

INTERAZIONI TRA SOSTANZE CHIMICHE E
VIRUS

Alcuni virus possono integrarsi nel genoma umano e svolgere un'azione procancerogena. A questi livelli possono interagire con le sostanze chimiche e far partire un processo che prima era silente, sinergizzando nella loro azione. Esempi: Virus Epatite B e aflatossina, Epstein Barr e N-nitrosamine nel carcinoma nasofaringeo, Papillomavirus e fumo nel carcinoma della cervice uterina. Quindi gli agenti chimici possono agire da promotori tumorali dopo l'iniziazione da parte di un virus e viceversa.

<u>Esiste una "dose soglia" per questi cancerogeni</u>? (sì) All'aumentare della dose di cancerogeno aumenta il rischio di neoplasia, ma per alcune sostanze la relazione dose- rischio non è lineare. Ad alte dosi, oltre un certo limite, si osserva morte cellulare e quindi paradossalmente riduco il rischio di neoplasia (il rischio si può definire "stabilizzato", ma si è già andati incontro a morte cellulare per cui la riduzione del rischio in questo caso non è una cosa positiva).

INTERAZIONI GENI-AMBIENTE E DIVERSITA' INDIVIDUALE

- Esiste una suscettibilità individuale alla cancerogenesi chimica che sicuramente può esser definita da variazioni
genetiche

- Esistono polimorfismi funzionali delle proteine, ad esempio a livello di tutti gli enzimi che metabolizzano sostanze xenobiotiche, o che inducono la riparazione del DNA, a livello di recettori che attivano la cascata fosforilativa, di geni che controllano il ciclo cellulare, ecc.

FATTORI INDIVIDUALI DI RISCHIO
RELATIVO:

- Variazioni individuali del metabolismo di agenti cancerogeni (estremizzando, se effettuo esami del DNA e osservo un polimorfismo che permette un'ottima metabolizzazione dei cancerogeni presenti nel fumo di sigaretta, la persona in esame potrà fumare di più di un altro soggetto e avere meno probabilità di sviluppare il
tumore.)

- Differenze nella capacità di riparazione del
dna

- Risposta a promotori tumorali

EPIDEMIOLOGIA
MOLECOLARE

Bisogna tenere in considerazione l'interazione geni-ambiente, quindi non solo il potere del cancerogeno ma anche: la capacità di formare addotti, la capacità di riparazione del DNA, la suscettibilità individuale, le dosi necessarie per indurre mutazioni, il tipo di mutazioni indotte, il metabolismo dei cancerogeni.

Quindi per effettuare una valutazione del rischio del cancro sono stati individuati specifici fattori ambientali: le radiazioni solare (UV), l'alimentazione e in particolare il "junk food", i virus (oggi ci sono vaccini per evitare il rischio, come quello per il Papillomavirus), il fumo di sigaretta.

CAUSE DI CANCRO: alimentazione, fumo e virus (le principali).

Quindi se devo investire 100euro per ridurre il cancro, li investo su istruzione-campagna contro il fumo. Se azzero il fumo, il 30% dei cancri non si sviluppano. Un paziente col cancro costa un sacco alla società: alcune che mio costano migliaia di euro a iniezione. (senza contare l'aspetto umano)

(*il sistema sanitario mondiale non sostiene più i costi dei trattamenti*: esempio di un nuovo pathway di trattamento e cura per la fibrosi cistica è il farmaco molecolare chiamato "kalideko" o "vertex 770", che però ha un costo di 300.000 dollari all'anno per paziente, pazienti che vivono 20-30-50 anni e che devono prendere il farmaco tutti i giorni). Questo è il costo del progresso scientifico.

Quindi voi come medici dovete ridurre l'entità del cancro per poter curare le altre malattie. Perché fumare la sigaretta non ce lo ha ordinato il dottore. Una volta non esistevano le sigarette e stavano bene lo stesso anche senza fumare.

Lezione di Patologia generale e fisiopatologia clinica (sem2) del 14/5/2013 (1)

LEZIONE DI PATOLOGIA 14.05.2013 – PROF. CASSATELLA

SBOBINATORE: Laura Sponga

REVISORE: Alessandro Depaoli

Parlando delle caratteristiche della proliferazione neoplastica, abbiamo visto alcuni parametri: la **frazione di crescita**, il **ruolo che gioca l'apoptosi**, il **ciclo cellulare** (il tempo del ciclo cellulare). Infine abbiamo inquadrato la **proliferazione neoplastica** come **continua e progressiva**, **ma variabile nel tempo**, con anche dei momenti di latenza a seconda del tipo di tumore.

C) CONTINUA E PROGRESSIVA MA VARIABILE NEL TEMPO

(slide 1) Presumendo che un tumore solide umano tragga origine da un'unica cellula maligna, deve effettuare circa **30 raddoppiamenti volumetrici** per raggiungere le dimensioni minime richieste per l'apprezzamento clinico. In genere la diagnosi si fa quando il tumore raggiunge almeno le dimensioni di un centimetro (che approssimativamente corrisponde a un grammo di peso e quindi a un miliardo di cellule). Questa figura vi fa vedere che, per raggiungere la dimensione minima clinicamente diagnosticabile, in teoria, se tutto procede senza intoppi, occorrerebbero 30 raddoppiamenti.

Dopodiché basterebbero pochissimi raddoppiamenti per ottenere delle masse tumorali mostruose, cosa che, tuttavia, non succede. Ci sono dei tumori in realtà, alcuni rarissimi tumori, che possono proliferare molto velocemente e raggiungere delle dimensioni notevoli, ma sono delle rarità.

(slide 2) Quindi non è così, evidentemente ci sono delle fasi, delle crescite variabili nel tempo. Quindi si ritiene che, al momento della diagnosi *(pannello b)*, probabilmente la massa tumorale in questione abbia una vita precedente. Ha un periodo di latenza, che noi conosciamo, che può avere tempi di crescita molto variabili: all'inizio lenti, poi esponenziali, o costanti, oppure rapidissimi. Poi, a seguito della diagnosi, il comportamento del tumore ha in genere questo andamento. *(La figura espone anche lo stesso concetto della slide precedente in forma più schematica).*

Nel *pannello d* si può apprezzare l'indice di proliferazione. Anche qui non esiste una regola. In genere, più un tumore acquista caratteristiche di malignità (quindi un tumore metastatico rispetto a un tumore primario), più il suo indice di proliferazione diventa alto; ma ci sono anche dei casi di metastasi che hanno un indice di proliferazione inferiore a quello di un tumore primario.

Insomma c'è una variabilità notevole nella crescita tumorale, con delle fasi di crescita variabile e delle fasi di latenza.

APPORTO NUTRITIVO: FASE AVASCOLARE/FASE VASCOLARE

(slide 3) Un fattore che contribuisce alla crescita di un tumore è **l'apporto nutritivo**, che è mediato dai vasi. Quindi si parla in generale di **crescita avascolare** e **vascolare** (attenzione a questi termini che possono ingannare!). La **fase avascolare** si riferisce alla crescita tumorale all'interno di un

tessuto condizionata dai vasi già presenti; in questo caso il tumore cresce finché la vascolarizzazione locale riesce a portare nutrimento a tutte le cellule. Poi, a un certo punto, la massa cresce e le cellule più lontane dai vasi non ricevono più ossigeno e possono morire. In questa situazione quello che può succedere è una **neovascolarizzazione**, cioè **il tumore promuove una neoangiogenesi**, cioè la formazione di nuovi vasi. Allora si parla di **fase vascolare**.

Quindi la fase avascolare si riferisce a quella di un tessuto basata sulla vascolarizzazione preesistente, mentre la fase vascolare si riferisce alla crescita condizionata dalla formazione di nuovi vasi, dalla neoangiogenesi, che è un fattore importante su cui si può intervenire per cercare di bloccare i rifornimenti e la formazione di nuovi vasi.

La neoangiogenesi va distinta dalla **vascuologenesi**. La **vasculogenesi si riferisce alla formazione dei vasi durante lo sviluppo e il differenziamento**. La **neoangiogenesi invece è la formazione di nuovi vasi su quelli preesistenti** ed è anche un processo fisiologico importante per esempio durante i meccanismi di riparazione della flogosi cronica, in cui c'è da ristabilire o sostituire tessuto.

(slide 4) Ma la **neoangiogenesi può anche favorire le metastasi**: infatti **non vengono prodotti dei vasi con una struttura normale**. I vasi che si formano sono difettosi, presentano delle lacune. In figura sono elencate le caratteristiche dei vasi normali, che sono maturi, stabili per struttura, funzione, hanno pareti basali ben formate e localizzate dove devono essere e così via. Invece nel caso della neoangiogenesi, soprattutto nei tumori, questa formazione di vasi può essere incompleta, instabile e le cellule possono ricoprire la parete in modo incompleto o avere funzioni anomale. Quindi la neoangiogenesi è difettosa e questa non perfetta architettura dei nuovi vasi **può favorire l'entrata di cellule maligne in circolo**.

(Slide 5) Immagine al microscopio a scansione della vascolarizzazione di un tessuto normale rispetto al tumore.

FATTORI PROANGIOGENETICI

(slide 6) L'angiogenesi è mediata da fattori proangiogenetici. Sicuramente tra quelli che giocano un ruolo fondamentale c'è **VEGF** (**vascular endothelial growth factor**), detto anche **VPF**, anzi è stato scoperto come fattore della permeabilità vasale (VPF) e poi si è visto che questa citochina è anche in grado di indurre l'angiogenesi.

Qui vedete queste condizioni: un tumore in **condizioni di ipossia**, oppure **stimolato da varie citochine**, magari prodotte dall'ambiente, o gli stessi **oncogeni che modificano l'espressione genica** possono portare all'espressione di VEGF da parte del tumore. Oppure il tumore può indurre lo stroma a produrre VEGF. VEGF lega recettori *(in figura schematizzati in maniera molto semplice)* che attivano una serie di risposte a livello della cellule endoteliali che promuovono l'angiogenesi (sopravvivenza e proliferazione della cellula endoteliale…).

E inoltre può anche stimolare la produzione di altri mediatori che servono al processo dell'angiogenesi.

Vi lascio una serie di figure che vi guardate con calma. Ci sono **vari recettori che legano VEGF** ed esistono **tanti tipi di VEGF**. In sintesi stiamo imparando a conoscere molto bene il signaling attivato da VEGF e oggi siamo in grado anche di collegare le vie di trasduzione ai diversi **effetti**

indotti dal VEGF: la **migrazione della cellula endoteliale**, la **proliferazione**, **sopravvivenza**, insomma tutti i fenomeni che contribuiscono alla neoangiogenesi.

VEGF può legare parecchi recettori, ma non entro nel dettaglio: è un argomento specialistico.

(slide 8) Esistono diversi membri della famiglia VEGF: **VEGF-A**, che è quello di cui stiamo parlando e che induce la angiogenesi, e altri membri VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D. Poi all'interno di ognuno di questi ci sono delle **isoforme** perché subiscono delle modificazioni post-traslazionali *(penso intendesse traduzionali NdR)* quando vengono prodotte.

Sulla destra viene illustrata un'altra categoria di molecole che possono indurre l'angiogenesi che sono le **angiopoietine**.

Qua vedete un altro schema che non ho tempo di illustrarvi in dettaglio.

(slide 9) Il messaggio è che stiamo iniziando a conoscere il ruolo di questi vari membri della famiglia VEGF. Per esempio **VEGF-C** e **VEGF-D** sono importanti ligandi di **VEGFR-3**, che può indurre anche la **linfoangiogenesi**. Inoltre abbiamo molecole che inducono la formazione di nuovi vasi e la sintesi di citochine in grado di promuovere la formazione di nuovi vasi linfatici. E poi ci sono altre funzioni molto specifiche di queste molecole nelle varie fasi di maturazione dei vasi.

(slide 10/11) VEGF non è l'unico. Questa tabella elenca alcuni dei fattori angiogenetici. (Sono tanti e di alcuni abbiamo già parlato):

- <u>**EGF**</u>;

- <u>**FGF2** o basic FGF</u> (fibroblast growht factor) molecola che agisce molto spesso in combinazione con VEGF e ha un effetto sinergistico;

- alcune <u>**chemochine**</u> hanno azione proangiogenetica, in particolare le **chemochine CXC che hanno la sequenza ELR**. (vi ricordo che ci sono alcune chemochine che hanno azione pro angiogenetica e altre che hanno azione angiostatica). Le chemochine proangiogenetiche sono molto potenti, una di queste è **IL-8**, cioè **CXCL8** (abbiamo discusso anche il meccanismo di azione proangiogenetica);

- **PGF** (placental growht factor), molto studiato in questi ultimi tempi.

(slide 12) Abbiamo la possibilità di studiare *in vitro* le proprietà proangiogenetiche di queste molecole. Tra i molti modelli esistenti, viene spesso utilizzato **l'uovo**: basta iniettare nell'uovo una sostanza presumibilmente proangiogenetica e si può vedere nel tempo la formazione di nuovi vasi.

TAPPE DELLA NEOANGIOGENESI

(slide 13) Il processo della neoangiogenesi prevede una serie di tappe illustrate in questa figura e in quella successiva. La **cellula tumorale produce questi fattori proangiogenetici**, che vanno a stimolare le cellule endoteliali in combinazione con altre molecole (soprattutto **enzimi**, che vanno a degradare la membrana basale in modo da liberare e rendere attivabili le cellule endoteliali). Gli

endoteliociti, pertanto, iniziano a proliferare e a spostarsi, formando delle **gemme basali** che si proiettano verso la fonte di sostanza che le sta stimolando (ossia la cellula tumorale). Si ha progressivamente la formazione di **nuove cavità** che portano alla maturazione e alla formazione dei vasi, che però, come detto prima, possono essere irregolari e incompleti.

(slide 14) In figura sono indicate le molecole essenziali per ogni tappa del processo angiogenetico.

(slide 15) Questa angiogenesi può essere dovuta alla produzione in concerto di sostanze proangiogenetiche da parte della cellula tumorale, oppure la cellula tumorale può influenzare l'ambiente, per esempio sfruttando l'azione dei **TAM** (i macrofagi che infiltrano il tumore). Infatti le **cellule tumorali producono quantità elevatissime di chemochine appartenenti a varie classi**; all'inizio non si capiva come mai, adesso sappiamo che queste chemochine servono a richiamare i leucociti. Nell'ambiente questi leucociti possono differenziare verso il fenotipo M2 (che poi nei tumori corrisponderebbe ai TAM). Questi macrofagi associati ai tumori a loro volta possono produrre **fattori proangiogenetici**, come VEGF e IL-8, ed **enzimi**, che favoriscono l'angiogenesi degradando la matrice extracellulare. La **degradazione della matrice** può determinare la liberazione di altri **fattori proangiogenetici** oppure di **fattori mitogenetici**, che possono a loro volta favorire la crescita, la sopravvivenza e la proliferazione delle cellule tumorali.

Quindi l'angiogenesi si localizza all'interno di un circuito che si instaura fra tumore e ambiente.

Anche la **transizione epitelio-mesenchimale** è a sua volta legata alla produzione di mediatori che possono essere prodotti anche dai leucociti che infiltrano i tumori.

(slide 16) Quindi non solo i macrofagi ma anche vari tipi di leucociti (e non solo!) possono partecipare a questo fenomeno della neoangiogenesi e linfoangiogenesi: **fibroblasti**, **macrofagi**, **cellule dendritiche**, **linfociti T**, **mastociti**, **neutrofili**.

TERAPIE

(slide 17) Tutto questo sta portando all'idea di tentare di **bloccare l'angiogenesi**. L'angiogenesi è un processo fondamentale per il nutrimento e la crescita dei tumori. Quindi si sono sviluppate tantissime molecole (**inibitori** e soprattutto **anticorpi monoclonali**) **contro questi recettori** che conosciamo: VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, recettori dell'angiopoietina *(Tie1 e Tie2 NdR).* Inoltre esistono molecole capaci **di bloccare il signaling** mediato da questi recettori. Questi approcci funzionano benissimo nei modelli animali e iniziano a essere anche nei tumori umani, anche se vengono associati ad altre forme terapeutiche.

Domanda: come fanno a non avere effetti collaterali pesanti? Ad esempio sull'endometrio…

Risposta: si cerca di indirizzare l'azione di questi anticorpi sul tumore stesso; sono terapie molto sofisticate e mirate.

INIBITORI

(slide 18/19) Per quanto riguarda l'angiogenesi abbiamo visto delle molecole capaci di attivare questo processo che noi conosciamo, quindi soprattutto fattori di crescita (VEGF e FGF) e poi ci

sono anche inibitori fisiologici del processo dell'angiogenesi. Gli inibitori sono tantissimi e di continuo se ne scoprono di nuovi. Il processo dell'angiogenesi è legato al bilanciamento tra la produzione e l'effetto degli attivatori e la produzione e l'effetto degli inibitori. Nel caso in cui prevalgano gli attivatori, l'angiogenesi sarà promossa, mentre, se prevalgono gli inibitori, sarà controllata e inibita.

(slide 19/20/21) Ecco una carrellata di **inibitori dell'angiogenesi** (molti non sono altro che dei prodotti di degradazione di **proteine naturali** o di **componenti della matrice extracellulare**):

- **angiostatina** (che è un derivato del taglio proteolitico del **plasminogeno** da parte di **metallo-proteasi**) è un potentissimo inibitore dell'angiogenesi;

- **fattori di crescita e alcune citochine che possono direttamente o indirettamente inibire l'angiogenesi**: gli **interferoni** inibiscono **indirettamente** l'angiogenesi perché inducono la sintesi di **alcune chemochine** (come MIG o **CXCL9**, IP-10 o **CXCL10** e I-TAC o **CXCL11**). Queste chemochine, che fanno parte della famiglia CXC, sono quelle che **non hanno la sequenza ELR** e quindi **hanno attività angiostatica** (le CXC si dividono in ELR e in non ELR, le ELR hanno, tra le altre attività, un'azione proangiogenetica e le altre hanno un'azione angiostatica) perché legano il recettore **CXCR3B**, **espresso dall'endotelio**. Ricordiamo che il CXCR3 (o CXCR3A), importante marcatore dei linfociti TH1, era noto da prima, ma non si capiva come mai i suoi ligandi avessero anche una funzione angiostatica se il CXCR3A non è espresso dalle cellule endoteliali. Poi è stato scoperto il CXCR3B che ha fatto tornare i conti.

Domanda: Di che interferone parliamo per l'induzione delle chemochine angiostatiche?

Risposta: **Gamma**, soprattutto, ma anche l'**alfa** più o meno agli stessi livelli del gamma. **Queste chemochine sono interferon-gamma inducible protein**, ma entrambi gli intereferoni attivano STAT1, che può attivare le stesse chemochine.

- **Platet factor 4** cioè CXCL4 (che lega sempre CXCR3B);

- **antitrombina 3**;

- **frammenti della prolattina**;

Si nota che molti **prodotti di degradazione di varie proteine**, anche plasmatiche, possono avere azione angiostatica.

Oppure proteine derivate dalla matrice extracellulare:

- **endostatina**, molto potente, frammento del collagene 17.

Quindi il messaggio è che, quando la matrice cellulare è attaccata dalle proteasi, può generare ancora una volta o **fattori di crescita** oppure **tutta una serie di inibitori dell'angiogenesi**, che usati singolarmente sono molto potenti.

(slide 24/23) Qualche anno fa queste molecole, endostatina e angiostatina, erano diventate molto di moda; uno studioso americano, che è morto due anni fa, venne alla ribalta perché aveva dimostrato che poteva curare i tumori semplicemente iniettando nell'animale endostatina.

Nella figura: trattamento con endostatina blocca completamente la formazione di vasi.

Quindi c’è stato un momento di esaltazione per l’impiego di questi inibitori dell’angiogenesi naturali che in certi tumori animali funzionano molto bene, ma che se trasferiti da soli nei tumori umani non funzionano o funzionano male. Ora si stanno studiando delle procedure alternative, che prevedono **l’uso combinato di molte di queste molecole** per cercare di **attaccare le diverse tappe dell’angiogenesi**. Quindi si possono usare inibitori endogeni dell’angiogenesi, (endostatina e interferoni), inibitori che bloccano VEGF oppure il segnale mediato dal recettore per VEGF, poi ci sono altri farmaci.

(slide25) Questa storia dell’angiogenesi è un altro esempio dell’**importanza dello stroma**, ossia dei fattori extratumorali che possono condizionare la crescita del tumore e contro i quali si può cercare di intervenire. Da questa figura si capisce che non solo è possibile attaccare le cellule tumorali bloccando direttamente la loro proliferazione, ma si può intervenire anche a livello dello stroma. Sono elencate le attività inibitrici che possono andare a colpire le **cellule endoteliali**, i **periciti**, i **fibroblasti**, la **matrice extracellulare**, i **leucociti**, le **cellule linfatiche**. Ci sono tutti questi farmaci biologici che mirano a colpire il bersaglio preciso, non a caso.

Domanda: Lei ha detto che in generale, ma non è una verità assoluta, i carcinomi diffondono prevalentemente per via linfatica invece i sarcomi prevalentemente per via ematica. Le volevo chiedere se c’erano stati degli studi che avevano dimostrato che questi diversi tipi di tumore determinavano, o direttamente o indirettamente, la produzione di un determinato tipo di VEGF.

Perché ha detto che l’A determina angiogenesi mentre invece il C e D soprattutto linfoangiogenesi, cioè è collegato a una stimolazione della formazione linfatici o ematici?

Risposta: Non lo so, sicuramente ci sono studi, può essere tutto il contrario di tutto, queste tabelle riassumono informazioni generali poi nel dettaglio evidentemente derivano da studi sui tumori. Anzi sicuramente è come dici tu, ma non so se c’è una divisione precisa per quanto riguarda la produzione di diversi fattori proangiogenetici.

(slide 26) Per concludere questa parte delle caratteristiche della proliferazione neoplastica.

D) AFINALISTICA

La proliferazione neoplastica è **afinalistica**, cioè è una proliferazione continua e irreversibile che non ha nessuna finalità, nessuno scopo. Il tumore continua a crescere semplicemente a spese dell’ospite.

E) AGGRESSIVA

Si parla di formazione neoplastica ovviamente maligna: il tumore tende a invadere l’ospite; all’inizio a infiltrarsi nel tessuto dove si impianta e poi cerca di localizzarsi a distanza.

CARATTERISTICHE FENOTIPICHE DELLE CELLULE NEOPLASTICHE MALIGNE

Vale a dire le proprietà che il colone neoplastico acquisisce mentre progredisce. Il fenotipo maligno è dovuto ad alterazioni molecolari sia **qualitative** sia **quantitative**, che si esprimono in una serie di anomalie e comportamenti:

1) Anomalie morfologiche, citologiche e funzionali

2) Anomalie del comportamento

3) Alterazioni metaboliche

4) Anomalie genetiche

L'acquisizione di tutte queste proprietà fenotipiche a un certo punto permette alla cellula tumorale maligna di acquisire potenzialmente la capacità di dare metastasi. In altre parole, **solo quando una cellula tumorale maligna ha acquisito una serie di proprietà, allora quella può dare la metastasi, ma non è detto che la dia**. Anzi, il processo della metastasi è assolutamente inefficiente; dal punto di vista della singola cellula, è quasi impossibile che la singola cellula dia metastasi. Ma procediamo con ordine.

1) ANOMALIE CITOLOGICHE, MORFOLOGICHE E FUNZIONALI

- Dimensioni cellulari e pleiomorfismo, le cellule tumorali hanno forma e dimensioni molto diverse tra di loro;

- Rapporto nucleo/ citoplasma, rapporto a favore del nucleo;

- L'aumento del numero dei nucleoli che sono riconoscibili;

- L'aumento della colorabilità (o **ipercromatismo**);

- Anomalie del citoscheletro;

- Quantità dei mitocondri, aumento del numero ovvio per il metabolismo;

- Variazioni del cariotipo;

- Modificazioni molecolari di tipo quantitativo e/o qualitativo;

- Assenza/iperespressione di molecole, o meglio perdita dell'espressione o aumento dell'espressione;

- Variazioni qualitative di molecole;

- Recupero di molecole di tipo immaturo: questa è una caratteristica importante. Certi tumori possono esprimere molecole di tipo immaturo che venivano espresse durante la vita embrionale e alcune di queste molecole possono fungere anche da **marcatori di alcuni tumori** (molecole che ci aiutano a sospettare la presenza di un certo tipo di tumore se vengono misurate);

- Modificazioni che possono risultare in aspetti, assemblaggi, combinazioni atipiche…

- …o che possono risultare, in casi estremi, in un "estraneizzazione" del tessuto.

2) ANOMALIE DEL COMPORTAMENTO

Gran parte di queste anomalie del comportamento derivano da studi fatti in vitro usando **cellule tumorali isolate** e studiate in vitro oppure **cellule trasformate in vitro**, per cercare di evidenziare le proprietà e cercare di spiegare il comportamento delle cellule tumorali.

- <u>Immortalità</u> *(slide 29-37)*

È la capacità di **replicare all'infinito**; è una proprietà delle cellule tumorali maligne, ma **non è essenziale per la malignità**. Sull'immortalità ci sono tanti studi, come penso abbiate studiato in biologia con la telomerasi. L'immortalità delle cellule tumorali **in parte** si spiega con la capacità di queste cellule di **riesprimere la telomerasi**. L'importanza di questo meccanismo è stata avvalorata sperimentalmente *(slide 34)* dalla trasformazione *in vitro* una cellula normale attraverso la trasfezione di geni implicati nella patogenesi e nello sviluppo dei tumori, tra i quali si è dimostrato necessario anche il gene della telomerasi.

Tuttavia **l'aumento della telomerasi non è l'unico meccanismo molecolare alla base dell'immortalità**. Negli ultimi anni sono stati identificati altri meccanismi che adesso sono definiti come **vie indipendenti dalla telomerasi** e ci sono alcuni tumori in cui questi meccanismi telomerasi indipendenti sono più evidenti. Si parla di **ALT** che vuol dire **alternative lenghtening of telomers**, cioè meccanismi alternativi di allungamento dei telomeri. Se qualcuno è interessato c'è questa referenza *(slide 35/36).*

Un'altra spiegazione è **l'autonomia dal punto di vista della provvigione dei fattori di crescita**: le cellule tumorali possono prodursi loro i fattori di crescita in maniera autocrina, oppure ci sono alterazioni geniche che vanno a colpire recettori per i fattori di crescita che rimangono sempre attivi.

- <u>Perdita dell'inibizione da contatto</u>

(slide 39) Se delle cellule normali vengono poste in una piastra di coltura, si depositano, si attaccano, proliferano e ricoprono la superficie in maniera omogenea. Dopodiché, quando hanno ricoperto tutta la superficie, non proliferano più, si fermano. Questo arresto non avviene nel caso delle cellule tumorali: proliferano, ricoprono la superficie, ma, anche dopo aver ricoperto tutta la superficie a disposizione, continuano a proliferare e formano delle **foci** (cellule impilate che al microscopio sono facilmente riconoscibili).

Come si spiega questo fenomeno? A un certo punto le cellule normali, quando ricoprono tutta la superficie, non proliferano più perché probabilmente si scambiano dei **segnali d'inibizione**. Questi segnali d'inibizione non funzionano neanche se vengono messe in coltura cellule normali e cellule tumorali: le cellule tumorali, anche se prendono contatto con le cellule normali, continuano a proliferare, mentre le cellule normali non proliferano. Quindi questo fenomeno si spiega con **l'incapacità delle cellule tumorali di percepire i segnali negativi**. Le possibili spiegazioni di questa perdita dell'inibizione da contatto sono **alterazioni molecolari della plasmamembrana**, magari perché perdono i recettori o i sensori che permetterebbero alle cellule tumorali di interagire, o **alterazioni dei meccanismi di traduzione** per attivazione di oncogeni che permettono alle cellule di continuare a proliferare e di mantenersi autonome.

Quindi questo comportamento, questa perdita dell'inbizione da contatto, aiuta anche a spiegare il comportamento in vivo, cioè la capacità di una cellula tumorale maligna, di proliferare, di non percepire più i segnali dell'ambiente, allontanarsi e migrare e infiltrare i tessuti.

- <u>Non necessità di ancoraggio per la crescita (crescita in sospensione)</u>

Come fa vedere questa figura *(slide 41)*, le cellule, per proliferare, hanno bisogno di attaccarsi a una superficie. Le superfici delle piastre di coltura, infatti, sono spesso ricoperte di proteine della matrice per favorire l'adesione e l'aggancio delle cellule normali. Le cellule tumorali maligne non hanno bisogno di attaccarsi alla piastre, non hanno bisogno di interagire con proteine della matrice ma possono, se il mezzo di coltura lo permette, proliferare in maniera autonoma, formando questi grumi di cellule in sospensione.

Come si spiega questa non necessità di ancoraggio per la crescita? Come già visto, con una serie di alterazioni:

a) **Alterazioni del citocscheletro**. L'organizzazione del citoscheletro è regolata da meccanismi di fosforilazione. Molti oncogeni codificano per protein-chinasi, che pertanto nella cellula tumorale possono essere iperattivate e fosforilano in modo alterato (in maniera continua, inappropriata e incontrollata) le proteine del citoscheletro. Le placche di adesione risultano così alterate e la cellula non risponde più ai segnali di adesione.

b) Le cellule tumorali tendono a disassemblare le **strutture di giunzione** (desmosomi). Tutte le strutture di aggancio sono difettose.

c) Le cellule tumorali hanno **meno aggregabilità omologa**.

Queste figure *(slide 43/44)* riprendono quanto detto riguardo al **Src** e agli oncogeni che codificano per i membri della famiglia Src. Il Src sempre attivo può andare a fosforilare i componenti delle placche di adesione, le proteine del citoscheletro, i microfilamenti e l'actina provocando un'alterazione di tali proteine. In pratica tutte le strutture qui raffigurate (giunzioni strette, desmosomi, giunzioni comunicanti…) vengono alterate. Pertanto le cellule assumono una forma rotondeggiante in coltura, non aderiscono più e non interagiscono tra di loro.

- <u>Diminuizione dell'adesività</u>

(slide 46) Anche in questo caso la causa può essere un'alterazione della superficie cellulare. Sono coinvolte in generale le **molecole di adesione**, e in particolare le **caderine**, che sono importanti per l'aggregazione omologa delle cellule. Studiate bene tutte le molecole di adesione, di cui sicuramente Berton ha parlato; sono tante: selectine, integrine, la famiglia della immunoglobuline e poi ci sono queste caderine. Ad esempio **PECAM-1** è una proteina che determina **l'adesione omologa delle cellule endoteliali**. Chiaramente esistono molte altre molecole che mediano le interazioni a livello delle giunzioni delle cellule endoteliali, tra cui c'è PECAM-1. PECAM-1 è anche una di quelle molecole, utilizzate dai leucociti, che favorisce l'ultima tappa della **trasmigrazione a livello delle giunzioni interendoteliali**. In figura si discrimina anche l'**adesione eterofilica**, cioè interzione tra cellule diverse, dall'**adesione omofilica**, tipica di **PECAM-**1 e delle **caderine**; infatti le caderine formano dei dimeri che collegano cellule dello stesso tipo.

Queste sono altre immagini delle cellule dell'intestino in cui vedete il ruolo delle caderine, sono delle immagini stupende *(slide 48-50)*.

Delle caderine si è già parlato a durante la trattazione dell'**APC**; se questo tumor supressor gene (che di norma limita i livelli di beta-catenina citoplasmatica) manca, la beta-catenina si libera e va a attivare TCF, un fattore di trascrizione che promuove la proliferazione. Inoltre esiste anche un pool di beta-catenina agganciato alle caderine. Quindi c'è anche questo collegamento tra le **caderine** e le **beta-catenine**. *(Il professore aveva preparato una figura ma dice di non trovarla…)*

In sintesi la diminuzione dell'adesività è spiegata dal fatto che **le cellule tumorali maligne non esprimono più o diminuiscono l'espressione o cambiano l'espressione delle caderine**, per cui questa interazione cellula-cellula viene persa.

- <u>Diminuzione dell'aggregazione omologa</u>

Questa figura è orribile *(slide 52)*, non spiega bene questo concetto, però vorrebbe invece illustrare una proprietà delle cellule normali. Questo è un esperimento in cui si dimostra che, se si disgrega un tessuto renale e insieme al tessuto epatico si fanno delle sospensioni cellulari e queste sospensioni cellulari si mettono insieme in coltura, quello che succede è che si formano degli **organoidi**, ciascuno dei quali composti da cellule che derivano tutte dal rene o tutte dal fegato. Quindi cellule degli stessi tessuti sospese e messe insieme a cellule degli altri tessuti tendono a riaggregarsi e a riconoscersi. Questo non succede assolutamente con le cellule tumorali. **Le cellule tumorali in sospensione non si aggregano**, anzi tendono addirittura a respingersi, e questo è dovuto a tutta una serie di modificazioni della membrana plasmatica che nel loro insieme aiutano a spiegare queste varie anomalie del comportamento.

- <u>Non necessità della presenza di fattori di crescita</u>

Per i motivi che abbiamo visto prima.

3) ALTERAZIONI METABOLICHE

Vediamo una serie di alterazioni metaboliche, che sono relativamente specifiche delle cellule tumorali, nel senso che un tempo (una decina di anni fa), si riteneva che alla base dello sviluppo dei tumori ci fossero tutta una serie di alterazioni metaboliche. In realtà non è così, **queste alterazioni metaboliche sono la conseguenza delle alterazioni geniche**.

- Aumento della via dei pentosi (favorisce la sintesi degli acidi nucleici) e quindi favorisce la proliferazione cellulare;

- Aumento degli enzimi che sintetizzano DNA e RNA;

- Aumento dei componenti della traduzione proteica;

- Aumento degli stati di fosforilazione delle proteine (soprattutto in tirosina): non va considerato un marcatore delle cellule tumorali, ma rappresenta comunque un'alterazione abbastanza importante;

- Glicolisi aerobica: fenomeno anche questo relativamente specifico delle cellule tumorali che negli ultimi anni si sta rivalutando. A differenza delle cellule normali, le cellule tumorali, anche in condizioni di presenza di ossigeno, producono ATP attraverso il ciclo di Krebs *(forse voleva dire "la glicolisi" NdR)* e non attraverso la fosforilazione ossidativa. Questo veniva considerato un marcatore specifico delle cellule tumorali. Oggi questo fenomeno, detto **effetto di Warburg**, si sta tentando di spiegare a livello molecolare e questa ossidazione del glucosio a acido lattico vedrebbe il coinvolgimento di questi geni: la p53 il c-Myc, HIF. È molto complicato.

ALTERAZIONI DELLA PLASMAMEMBRANA *(slide 56)*

Sono tantissime le alterazioni che possono avvenire a livello della plasmamembrana. Per esempio:

- **Le cellule tumorali si caratterizzano per l'espressione di <u>nuovi antigeni</u>**, in realtà possono essere espressi nuovi antigeni, può diminuire l'espressione degli antigeni, possono essere cambiarti o ci possono essere variazioni quantitative dell'espressione. L'espressione di nuovi antigeni è un processo importante perché può essere utile per **stimolare ad esempio la risposta immunitaria**;

- Aumento dei fenomeni di secrezione e di *shedding*, cioè liberazione di molecole di superficie;

- Alterazioni quantitative dei **glicolipidi** o delle **glicoproteine** di membrana; possono cambiare, possono essere persi;

- Alterazioni dei processi più che di **fagocitosi** di **endocitosi** (significativi perché servono a recuperare nutrimento);

- Modificazione dei processi di adesione, cambiamenti nell'espressione di molecole di adesione che possono anche condizionare movimento, interazione con altre cellule, favorire l'inibizione da contatto;

- Alterazione dei meccanismi di trasporto, della permeabilità;

- Alterazioni di tutti quei meccanismi che mediano l'interazione con le cellule vicine e che quindi determinano insensibilità ai segnali ambientali;

- Alterazioni del citoscheletro, che quindi hanno ripercussioni anche sulla mobilità delle proteine, dei componenti di superficie;

- Aumentata agglutinabilità a zuccheri che possono essere utilizzati in esperimenti (proprietà che vedono in laboratorio);

- Aumento o diminuzione (c'è scritto alterazione ma va vista sempre come aumento o di munizione, più che altro aumento) di enzimi di superficie: questi enzimi di superficie possono essere molto importanti per favorire l'infiltrazione della cellula tumorale nell'ambiente, nello stroma, perché agiscono a livello dei componenti della matrice extracellulare;

- Aumento delle **cariche negative a livello della superficie della plasmamembrana**, sempre legata a una modificazione dell'espressione di glicolipidi e glicoproteine. L'aumento delle cariche negative è un altro fattore che favorisce l'inibizione da contatto; addirittura si pensa che favorisca il respingimento tra una cellula e l'altra che poi determina il processo del distacco delle cellule tumorali maligne, l'infiltrazione nelle cellule dei tessuti, e quindi il movimento e la metastasi.

(slide 57) Questa è una figura schematica che elenca queste alterazioni della plasma membrana:

A) Aumentata espressione di glicoproteine, con conseguente aumento dell'esposizione di cariche negative;

B) Aumento di tutti i meccanismi di trasporto (glucosio, aminoacidi)

C) Aumentata espressione di proteasi di membrana e di glicosidasi (collagenasi)

D) La membrana è molto più permeabile e perciò la cellula tumorale secerne continuamente enzimi, quali l'attivatore del plasminogeno (serin-proteasi) capace di degradare proteine come fibronectina, fibrina, glicoproteine varie, proteine della matrice extracellulare (l' iniezione in animali di anticorpi contro l'attivatore del plasminogeno inibiva le metastasi); la catepsina, una proteina che degrada actina, miosina, laminina, collageno; la ialuronidasi, che degrada l'acido ialuronico;

E) Maggiore densità di cariche negative, aumento di acido sialico, aumento di fosfolipasi cariche negativamente sono tutti fattori che contribuiscono alla diminuzione della densità omotipica;

F) Aumentata espressione dei recettori per i fattori di crescita, che può essere spiegato a livello molecolare dall'attivazione di oncogeni (per esempio l'iperespressione di un gene che codifica per questo recettore);

G) Aumento dei recettori per la laminina (componente della membrana basale dei vasi);

H) Diminuzione dell'espressione dell'MHC di classe I: è un meccanismo di *tumor escape*, uno di quei meccanismi che il tumore utilizza per sfuggire alla risposta immunitaria;

I) Espressione di nuovi antigeni, immunogenici o meno.

Domanda: La mancata espressione di MHC I non induce il riconoscimento di cellule tumorali da parte delle cellule NK?

Risposta: Hai detto una mostruosità, come fa qualcosa che manca a favorire il riconoscimento? Manca un pezzo a quest'affermazione, non è sbagliata. Il discorso giusto è che le cellule NK hanno dei **recettori attivatori che riconoscono ligandi su cellule varie** e poi hanno **recettori inibitori che sono attivati i vari tipi di MHC I**. La cellula NK deve essere vista come una cellula che tocca. Se, quando tocca con i recettori che usa, trova anche MHC di classe I, queste interagiscono con i TIR, i fattori inibitori, e mandano i segnali negativi che bloccano l'azione dei recettori positivi, ma ci deve essere un meccanismo di riconoscimento positivo da parte delle cellule NK. Quindi un meccanismo di riconoscimento positivo, che è bloccato da MHC I; la cellula NK ha recettori che riconoscono cellule bersaglio capaci di mandare segnali positivi che attivano le cellule NK, che però si fermano se la cellula bersaglio ha MHC I. È come se la cellula NK fosse sempre pronta a far fuori tutto quello che tocca, ma si blocca se c'è MHC I.

Domanda: Quindi in teoria la diminuzione di MHC di classe I dovrebbe favorire l'attivazione delle cellule NK….

Risposta: Infatti sorge spontaneo chiedersi come mai, se la cellula tumorale si difende dai citotossici diminuendo classe prima, non soccombe al riconoscimento da parte delle NK? Evidentemente manca un pezzo, manca qualcosa. A un certo punto della progressione delle cellule tumorali evidentemente ci sono altri meccanismi che impediscono alle cellule NK di funzionare, o alle cellule tumorali di resistere. Manca un pezzo alla storia. Quindi **non c'è una risposta**. Le cellule NK infatti sono cellule dell'innata innata, intervengono all'inizio della risposta immunitaria ed eliminano le cellule prima che intervenga l'immunità specifica. Quindi non si può pensare che l'immunità innata supplisca *(quella specifica?)*. Questo accade già a un livello di resistenza del tumore o di incapacità da parte del sistema immunitario di funzionare.

(slide 58) Questo è un riassunto di quanto detto. C'è anche qualcosa in più, come la resistenza all'apoptosi, di cui abbiamo già parlato, e altri concetti che vi riguardate con calma.

(slide 59) Questo è un altro importantissimo dato sperimentale. Come detto prima, tutte queste proprietà molto spesso si basano su **osservazioni fatte *in vitro* su cellule trasformate in vitro**. Naturalmente queste osservazioni devono essere validate dal fatto che questa trasformazione fatta *in vitro* riproduca un tumore nell'animale sperimentale. In altre parole **non basta trasformare una cellula *in vitro*, vedere che ha tutte queste proprietà per dire che quello che sto vendendo è veramente il comportamento in realtà di una cellula tumorale maligna**. Bisogna dimostrare che quella cellula trasformata *in vitro* veramente sia in grado di dare un tumore. E questo si fa iniettando le cellule trasformate nell'animale, per verificare che queste cellule siano in grado di produrre un tumore sperimentale.

(slide 60) Un'altra proprietà: la **capacità da parte delle cellule tumorali di sfuggire alla risposta immunitaria** e questo avviene nel tempo.

METASTASI *(slide "METASTASI")*

La metastasi è la **riproduzione a distanza di un tumore primario senza rapporto di contiguità con il tumore primitivo**. È un tumore a distanza. Può anche essere molto vicino in realtà, comunque è un **tumore secondario che deriva da un tumore primario, senza rapporto di contiguità**.

Aspetti della metastasi *(slide "Metastasis Facts")*:

- In generale **fino al 70% dei pazienti a cui viene diagnosticato un tumore già invasivo probabilmente ha già una metastasi da qualche parte**. Nel in cui un medico diagnostica un tumore primario, la preoccupazione principale è che ci siano già metastasi. Infatti i primi esami da fare in un paziente che ha un tumore primario, indipendentemente dalla sede, sono **la radiografia al polmone** e **l'ecografia al fegato**. Si fanno degli esami poco invasivi, o relativamente poco invasivi (i raggi sono sempre pericolosi) ma bisogna fare delle scelte. E si fa subito un'ecografia o una radiografia.

Domanda: Ma se ha detto che i carcinomi tendono a diffondere prevalentemente per via linfatica, cioè la radiografia e l'ecografia, rispettivamente al polmone e al fegato, va fatta comunque? Anche se stiamo parlando di un carcinoma?

Risposta: Eh certo! Va fatta comunque. I carcinomi **iniziano** a metastatizzare per via linfatica ma poi, dalla via linfatica, passano alla via ematica e vanno in altri vari distretti. Certo, si toccano i linfonodi se è possibile: i linfonodi metastatizzati infatti possono essere ingrossati, diventano palpabili, duri, attaccati, ecc. Io parlavo di organi frequentemente metastatizzati da tumori primari, cioè il polmone e il fegato.

- **Un numero variabile di cellule tumorali sono rilasciate ogni giorno nella circolazione.** È probabile che, in un paziente che ha un tumore, se si cercano le cellule in circolo, si possono trovare. Però **il riscontro di cellule tumorali in circolo** **<u>non dice automaticamente che c'è anche la metastasi</u>**. Non vuol dire che c'è per forza la metastasi solo perché sono state riscontrate delle cellule tumorali in circolo. Questa tabella cerca di spiegare tale affermazione. Sono presentati tre pazienti, che hanno tumori di dimensioni differenti, in cui viene riscontrato un numero molto diverso di cellule tumorali nel sangue. Viene stimato il numero di cellule rilasciate dal tumore nell'arco di 24 ore: rispettivamente 5 miliardi, 230.000, 37.000; tuttavia non si apprezza nessuna correlazione tra **il numero di cellule rilasciate nelle 24 ore** e **la sopravvivenza**. Attenzione: trovare cellule nel sangue ha comunque un significato medico, ma **non è detto che ci sia per forza la metastasi**; certo, bisogna fare degli esami. Dunque è possibile riscontrare delle cellule circolanti tumorali in pazienti che magari non svilupperanno metastasi diagnosticabili o che verranno diagnosticate.

- **L'angiogenesi è un fattore che favorisce e promuove la metastasi**.

(Slide "METASTASI") Affinché la metastasi si stabilisca, si devono **verificare dei fattori che dipendono dalle cellule tumorali e dall'ospite**. Quindi il processo della metastasi è condizionato, da una parte, dalle proprietà che le cellule tumorali devono acquisire per dare metastasi e dall'altra dall'ospite.

*(Slide "Figure 1.")***TAPPE**

Il processo della metastasi è un processo che avviene secondo diverse tappe (illustrate in questa figura).

Ci deve essere la **formazione di un tumore primario**. A un certo punto questo tumore primario deve produrre delle cellule capaci di invadere e infiltrare il tessuto (quindi le cellule devono acquisire le capacità di staccarsi dalla massa primaria e d'infiltrate il tessuto); poi queste cellule si muovono e magari entrano in circolo nei vasi. Una volta entrate in circolo devono superare tutta una serie di meccanismi a loro molto sfavorevoli (tanto per dirne uno: l'attacco del sistema immunitario). Devono riuscire a sopravvivere; già arrivare fino a qua è un successo per la cellula tumorale. Ammesso che sopravvivano e resistano a tutti i fattori negativi, devono a un certo punto fermarsi e anche qui l'arresto è condizionato da tutta una serie di elementi a sfavore della cellula tumorale maligna. Ammesso che si fermi, non è detto che vada avanti, perché magari trova un ambiente sfavorevole, arrivano le cellule immunitarie, oppure si sfracellano a livello dei capillari. Ammesso che vada avanti, vedremo quali sono le modalità di proliferazione una volta che la cellula tumorale si è fermata; magari è in grado di uscire dai vasi perché trova i recettori giusti, l'ambiente, resiste, ecc. Quindi deve avere anche la capacità di fuoriuscire. Deve avere la capacità di entrare *(NdR nei vasi)*, perché non è mica facile superare la barriera endoteliale, così come deve avere la capacità di uscire *(NdR dai vasi)*, e non è mica facile uscire. Ammesso che esca, potrebbe fermarsi, trovare un ambiente sfavorevole, quindi potrebbe morire o essere uccisa o rimanere dormiente oppure andare avanti, cominciare a proliferare, magari indurre l'angiogenesi, fino a dare una metastasi macroscopica.

Vedremo che tutte queste fasi sono molto difficili da superare.

Come già detto all'inizio dunque **il processo della metastasi è assolutamente inefficiente dal punto di vista della singola cellula**. La probabilità che una cellula tumorale capace di dare una metastasi la dia è praticamente inesistente. La probabilità è minore di quella di vincere al Superenalotto; tuttavia basta che una singola cellula riesca a farlo, e, se si hanno in gioco 5 miliardi di cellule al giorno, per la legge delle probabilità questo può succedere.

Lezione di Patologia generale e fisiopatologia clinica (sem2) del 15/5/2013 (1)

Lezione di Patologia Generale e Fisiopatologia del 15.05.2013

Sbobinatore: Torresani Evelin

Revisore: Ekinde Sean

Prof. Minuz

[Termine incerto] > Si riferisce alla parola precedente

[Registrazione disturbata] > Una o più parole incomprensibili

EQUILIBRIO ACIDO-BASE

Riassumiamo i concetti che abbiamo visto dell'equilibrio acido-base. L'acidosi è una condizione molto più comune di quanto non sia l'alcalosi per molti aspetti, perché è naturale che durante il [Registrazione disturbata] del metabolismo cellulare si generino composti organici con valenza acida e quindi, se non avviene un'adeguata eliminazione, questo è normale che si attivi e inoltre dall'attività metabolica si genera anidride carbonica; l'anidride carbonica è in equilibrio con l'acido carbonico nella forma dissociata, che può costituire un sale e voi sapete che questo è il sistema tampone bicarbonato. D'altra parte la CO2 può essere eliminata solo per via respiratoria e quindi una condizione di insufficienza respiratoria determina acidosi quando questa si accompagna ad ipercapnia. Quando si ha un'insufficienza respiratoria l'aumento di CO2 si accompagna alla generazione di bicarbonato, il che potenzia il sistema tampone però allo stesso tempo determina una condizione di acidosi, per accumulo di acido carbonico. Quindi il pH nelle forme di insufficienza respiratoria con ipercapnia tende all'acidosi.

La generazione di bicarbonato richiede un'attività enzimatica, le amidasi carboniche spingono la reazione verso la formazione di acido carbonico anziché la forma dissociata acqua e anidride carbonica e quindi richiede un certo intervallo di tempo. Allora se abbiamo un'insufficienza respiratoria acuta, un arresto respiratorio, un arresto cardiocircolatorio in cui prevalga l'aspetto respiratorio, o comunque un'insufficienza respiratoria grave avremo un accumulo di anidride carbonica che non si accompagna immediatamente ad un aumento del bicarbonato perché c'è un intervallo di tempo per cui, vi ricordate quell'equivalenza che era stata fatta, di tipo mnemonico, per quanto riguarda la quantità di anidride carbonica in mm/Hg, la concentrazione misurata come

pressione e relativa e la concentrazione in moli, mmol di bicarbonato e vedete che per ogni +10 di CO_2 (da 40 si va a 50, 60) l'aumento di acido carbonico quindi di bicarbonato è +1,+2 mmol quindi un incremento molto modesto. 60/2 mm/Hg vuol dire 26 mmol di bicarbonato. Nell'insufficienza respiratoria cronica, l'incremento del bicarbonato è più consistente perché il sistema è in grado di generare più bicarbonato attraverso l'attività delle amidasi carboniche. Risultato: con 60 mm/Hg di CO_2 presenti in circolo, abbiamo un +4 di bicarbonato, quindi vuol dire 28. Ovviamente i valori possono salire consensualmente fino a che non si arrivi ad effetti tossici, neurotossici della CO_2 che porta a morte, quindi l'aumento del bicarbonato tende ad appiattirsi anche se può aumentare ulteriormente se esiste anche un'alcalosi metabolica.

La sintesi è questa, compenso renale nell'acidosi, per mancata eliminazione di CO_2. Se il difetto è principalmente nell'eliminazione di acidi, il compenso è invece respiratorio. In un'acidosi di tipo respiratorio il compenso non può essere che renale, il recupero di bicarbonato, e questo aumenta anzi fa virare in alcuni casi verso l'alcalosi metabolica, un quadro misto. Se il difetto è renale, ad esempio mancanza di eliminazione di acidi oppure generazione di un eccesso di acidi, di anidride scompensato, oppure perdita di bicarbonato, tubulopatie, condizione più frequente ancora la diarrea, il compenso è respiratorio. Acidosi, stimolo ai chemocettori centrali, attività respiratoria più intensa, iperventilazione e si riduce la CO_2. E più compenso metabolico che può derivare anche dal vomito che si manifesta nell'acidosi e che determina una perdita netta di acidi, perché l'acido cloridrico è prodotto dall'attività secretiva delle cellule parietali.

L'alcalosi è meno frequente perché presuppone una condizione che si genera meno frequentemente, cioè il fatto che si generino alcali e questo è quasi impossibile però ci sono alcune condizioni: l'iperaldosteronismo in cui non è che si generino alcali ma si ha un eccesso di perdita di acidi oppure la perdita di acidi può essere eccessiva ad esempio nel vomito, soprattutto nelle manovre invasive come nell'inserzione dei sondini naso-gastrici per cui c'è una suzione del succo gastrico e perdita netta di acido cloridrico. L'eccesso di introduzione di alcali, latte più bicarbonato, può accadere più frequentemente nelle condizioni in cui ci sia una nutrizione che viene dall'esterno, allora questo per via endovenosa diretta. Un'altra cosa che può verificarsi, l'alcalosi può essere secondaria ad una fase di compenso ad un'acidosi, se io ho una condizione di insufficienza respiratoria con eccesso di anidride carbonica in circolo ho aumento di bicarbonato, se riprende l'attività respiratoria ho un intervallo di tempo nel quale l'eccesso di bicarbonato può determinare di per sé un'alcalosi perché il contenuto di CO_2 decresce ma la metabolizzazione in circolo del bicarbonato è più lenta, c'è sempre un intervallo nella formazione del bicarbonato ma anche nell'eliminazione; per cui dopo una correzione di un'acidosi sia di tipo respiratorio sia di tipo metabolico, ad esempio il diabete scompensato di tipo I che porta chetoacidosi, cioè una carenza assoluta di insulina nel diabete giovanile, se si somministra insulina si corregge il disturbo metabolico, la cellula riprende ad utilizzare lo zucchero, abbiamo una condizione di acidosi che può virare in una seconda fase per effetto di meccanismi di compenso che si sono instaurati, verso una transitoria alcalosi. Quindi considerate l'alcalosi anche come una situazione transitoria che può seguire la correzione di uno stato di acidosi. Nell'alcalosi quello che si determina è una modificazione del pH verso l'alto e in molte condizioni, quelle che sono le alcalosi di tipo cosiddetto metabolico, un eccesso di bicarbonati, ad esempio la cattiva correzione di un'insufficienza respiratoria acuta, è la fase successiva. Una condizione di alcalosi deprime l'attività respiratoria in questo senso può rappresentare un compenso perché determina un aumento della ritenzione di anidride carbonica, però è un compenso parziale perché si determina ipossia quindi viene stimolato nuovamente il centro respiratorio. Un esempio molto lampante di tutto ciò è in sequenza [Termine incerto] alla respirazione forzata, si elimina molta CO_2 e si vira verso l'alcalosi. Questo determina automaticamente una cessazione dell'attività respiratoria. Però la cessazione dell'attività respiratoria è parziale perché comincia lo stimolo da ipossia e quindi riparte l'attività respiratoria. Quindi il meccanismo di compenso attraverso la modulazione dell'attività

respiratoria ha una qualche efficacia però molto spesso determina un'alterazione poi dell'ossigenazione.

Vi ricordate nelle insufficienze respiratorie croniche il respiro di Cheyne-Stokes sulle alterazioni periodiche date proprio dal fatto che si vira rapidamente da condizioni di più alta concentrazione di CO_2 verso concentrazioni più basse e questo è anche determinato, regolato dal fatto che si modifica la concentrazione di ioni idrogeno. Quindi il compenso respiratorio nell'alcalosi, attraverso la riduzione dell'attività respiratoria è un compenso non efficacissimo e comporta variazioni dell'ossigenazione. È particolarmente temibile in soggetti critici, l'ipossia che si determina può precipitare la situazione generale.

La forma metabolica è piuttosto rara. La tipica manifestazione è proprio quella del paziente che è nutrito dall'esterno (terapia intensiva) oppure che ha dei sondini dei drenaggi che rimuovono l'acido oppure nell'iperaldosteronismo si determina un'alcalosi respiratoria da perdita netta di ioni idrogeno.

Relativamente più frequente è l'alcalosi di tipo respiratorio, perché sostanzialmente è quella che si determina quando ci sia una disregolazione centrale, ad esempio nei traumatizzati cranici oppure nelle condizioni psichiatriche. Solo però nei soggetti cronici può esserci una disregolazione centrale così marcata e persistente da vincere i meccanismi di compenso che passano attraverso l'arresto respiratorio. Il compenso renale è relativamente poco efficiente perché l'unico meccanismo è quello di eliminare il bicarbonato che non è una risoluzione del quadro. Quindi di regola nei meccanismi di alcalosi di tipo respiratorio il compenso è dato proprio dall'arresto dell'attività respiratoria quando questo sia possibile. Una condizione di questo tipo si determina tipicamente nella respirazione in alta quota, bassa ossigenazione, stimolo del centro respiratorio, lo stimolo del centro respiratorio è continuo perché l'ossigenazione non può essere aumentata perché la concentrazione di ossigeno è bassa, risultato: aumento dell'eliminazione dell'anidride carbonica grazie ad un'attività respiratoria più intensa guidata dai livelli di ossigeno nell'aria. Questo determina il cosiddetto mal di montagna quei sintomi che compaiono nell'esposizione ad alta quota che sono dovuti spesso ad uno stato di alcalosi. L'alcalosi determina dei fenomeni accessori rilevanti oltre alle alterazioni dello stato di coscienza anche fenomeni di tetanismo perché si riduce la quota di calcio ionizzato libero e quindi una condizione di maggiore eccitabilità neuro-muscolare. Compaiono le crisi tetaniche nell'alcalosi.

Anche qui siamo in una condizione di alcalosi di tipo respiratorio, la CO_2 si riduce ovviamente, questo è il meccanismo con cui si cala [Termine incerto] verso l'alcalosi, si riduce la concentrazione di bicarbonato in modo tanto maggiore, tanto più protratto è lo stato di alcalosi respiratoria.

DIAGRAMMA DI DAVENPORT

Voi troverete molto spesso delle rappresentazioni di questo tipo dei meccanismi di compenso e delle variazioni relative di bicarbonato, di anidride carbonica e pH nelle diverse condizioni. Questo si chiama diagramma di Davenport. È riportato in molti testi di medicina, soprattutto medicina di emergenza perché dà una rappresentazione grafica della predizione dei valori di pH e di anidride carbonica e di bicarbonato sulla base dell'incrocio di questi 3 parametri. Faccio alcuni esempi di come leggere queste tabelle e come interpretare l'andamento di queste curve. In questa condizione qui abbiamo anidride carbonica alta, bicarbonati alti, condizioni di acidosi respiratoria, il pH è basso. Questa linea interseca e indica la relazione tra anidride carbonica e bicarbonato e i relativi valori di pH. Vedete che la presenza di un meccanismo di compenso bicarbonato fa si che la variazione di pH resti relativamente contenuta soprattutto nelle forme respiratorie da insufficienza respiratoria cronica, perché l'aumento dell'anidride carbonica si accompagna ad un marcato incremento di bicarbonati. Nelle forme acute la variazione dell'anidride carbonica non si

accompagna ad un incremento rapido dei bicarbonati, richiede tempo, risultato che un'insufficienza respiratoria acuta, il classico arresto cardio-respiratorio, c'è una brusca variazione del pH verso una condizione di acidosi. Valori di quest'ordine di grandezza sono del tutto incompatibili con la vita. Una condizione di acidosi metabolica si accompagna ad una riduzione di bicarbonati. La variazione verso il basso dei bicarbonati si accompagna a bassi valori di anidride carbonica; cioè in una condizione di acidosi metabolica, l'aumentata attività respiratoria abbassa i valori di anidride carbonica in circolo e questo determina il compenso. Elimino gli acidi volatili. Le linee blu legano i valori di bicarbonato con quelli di CO2. L'acidosi metabolica è caratterizzata da un pH acido, da bassi livelli di bicarbonato e bassi livelli di anidride carbonica. L'alcalosi respiratoria avrà un pH alcalino, bassi bicarbonati e bassi valori di anidride carbonica. L'alcalosi metabolica avrà dei valori di pH alti, e relativamente alto valore di anidride carbonica. Tutta questa capacità predittiva per cui posso derivare il valore del bicarbonato sulla base della CO2, non è più valida in caso di squilibri misti perché si può avere, pensate ad uno scompenso cardiaco, una insufficienza di ossigenazione ai tessuti, una generazione di lattato e quindi un'acidosi di tipo metabolico però si ha anche edema polmonare e quindi ho un'acidosi respiratoria. Quindi in un'insufficienza cardiaca nella fase dell'edema polmonare c'è un duplice meccanismo che porta ad acidosi, risultato, mi trovo in una condizione in cui il viraggio verso valori di pH molto bassi avviene molto più rapidamente di quanto atteso perché ho accumulo di anidride carbonica assieme al consumo di bicarbonato e quindi la capacità del sistema tampone viene decurtata notevolmente. Quando non vi è una corrispondenza nei test di laboratorio, fra valore di CO2 e valore di bicarbonato e quello desunto di pH, vuol dire che si è davanti ad un quadro misto. Un valore di bicarbonato inaspettatamente basso in un'insufficienza respiratoria, vuol dire che c'è anche uno scompenso cardiaco o c'è un'acidosi metabolica ad esempio, c'è un'insufficienza renale oppure una chetoacidosi. Quindi tutte le volte che non si riesce a trovare una corrispondenza nella formuletta che vi avevo fornito oppure su tabelle di questo tipo sulla base dei valori dei vari parametri, vuol dire che c'è un quadro di tipo misto. È estremamente comune che si determinino quadri misti, l'insufficienza respiratoria che si corregge porta ad un'alcalosi di tipo metabolico per accumulo di bicarbonati ad esempio. L'acidosi metabolica, chetoacidosi, porta ad un'alcalosi respiratoria perché c'è un'attività respiratoria che prosegue. nelle fasi di passaggio da un quadro puro di acidosi si può avere un viraggio verso l'alcalosi.

C'è un metodo molto diffuso per predire la presenza di una sostanza acida nell'organismo di cui non ho la possibilità di determinare la natura. Se si ha uno scompenso cardiaco, si forma lattato, si può misurare, se si ha un'insufficienza renale, si potrebbe misurare, ma non si fa di solito, la concentrazione di fosfati, di solfati, se si ha un'intossicazione da acidi, farmaci ad alte concentrazioni che siano degli acidi, si può evidenziare, smascherare la loro presenza attraverso un calcolo: cioè il fatto che sostanzialmente in circolo abbiamo dei sali, allora tutte le volte che si trova uno squilibrio marcato tra concentrazione dei principali cationi e dei principali anioni, ci si trova davanti ad un gap anionico, vuol dire che c'è una quantità di acidi presenti di cui non vedo la presenza. Si misurano sodio, potassio, e già questo mi dà quasi tutto, più calcio, e il cloro e il bicarbonato dall'altra. Il pK anionico cioè la differenza, cioè gli acidi non misurati presenti in circolo sono circa 15 mmol/L. Tutte le volte che si generano acidi in eccesso, insufficienza renale, scompenso cardiaco, lavoro in condizioni di anaerobiosi, scompenso diabetico nel diabete di tipo I , aumenta il pK anionico ed è sempre indicativo di un'acidosi di tipo metabolico . C'è un'eccezione, il pK anionico non si modifica se c'è una perdita di bicarbonati. Se si ha un'acidosi da difetto tubulare per cui perdo cronicamente bicarbonati o da diarrea, il pK anionico non si modifica perché non è modificata la concentrazione degli acidi ma si perdono delle basi.

Le reazioni chimiche da tenere presente sono quelle tra acidi forti e acidi deboli, per cui il sistema tampone è sale + acido debole, se arriva un acido forte viene tamponato e forma un sale. È un sistema aperto, il sistema bicarbonato viene mantenuto in equilibrio, si genera CO2, si genera

bicarbonato ma viene mantenuto l'equilibrio per continua eliminazione per via respiratoria e il bicarbonato è quello che determina poi le concentrazioni alte di CO_2 in circolo perché serve da sistema tampone quindi viene preservato in circolo, la vita del bicarbonato in circolo è piuttosto lunga nel tempo, e questo crea quelle latenze nelle correzioni da uno stato di acidosi si può passare ad uno stato di alcalosi semplicemente per aver corretto l'acidosi. Tenete presente poi che molto spesso i quadri sono misti per cui non sempre si riesce sulla base di formule o sulla base della lettura dei diagrammi di Davenport a predire il valore di bicarbonato, di CO_2 sulla base del pH perché i bicarbonati sono stati consumati dalla presenza di acidi, un'acidosi respiratoria, un quadro misto tipico. Per cui ci si può trovare davanti a variazioni di pH verso l'acidosi molto più marcate di quanto non sia atteso.

INSUFFICIENZA EPATICA

Il fegato viene trattato,(la fisiopatologia clinica tratta i meccanismi che stanno dietro alla grandi alterazioni che stanno dietro allo stato di equilibrio, l'omeostasi, gli aspetti più d'organo non vengono trattati) perché è un organo centrale e perché una delle condizioni più comuni associate all'insufficienza epatica, la cirrosi epatica, si caratterizza anche da spiccate alterazioni dell'emodinamica sistemica e locale. In più l'insufficienza epatica genera alcune alterazioni metaboliche che sono da decenni utilizzate come spia di processi più sistemici.

Il fegato ha molteplici funzioni:

- È sede principale di neosintesi di glucosio e degli aminoacidi
- È sede di demolizione e riassemblaggio del glicogeno
- È sede di sintesi e degradazionedelle proteine, moltissime, quasi tutte le proteine del sangue
- È sede di metabolizzazione ed escrezione di sostanze come gli ormoni e i farmaci
- È sede di sintesi delle lipoproteine, di assemblaggio delle lipoproteine

Quindi la regolazione del metabolismo glucidico e lipidico, oltre a quello aminoacidico, è fortemente determinato dalla capacità del fegato di svolgere in modo costante la sua funzione. La funzione del fegato è quella di fornire all'organismo nutrienti durante la fase di digiuno, perché è sede della gluconeogenesi, durante la notte, è sede dell'assemblaggio delle lipoproteine che sono molto persistenti in circolo, quindi forniscono acidi grassi e colesterolo ai tessuti indipendentemente dall'assunzione di cibo e forniscono proteine e aminoacidi che persistono in circolo molto tempo dopo l'assunzione del cibo. Quindi dal punto di vista filogenetico e la collocazione del fegato al termine della circolazione portale è funzionale a questo compito di riassemblaggio e fornitura di nutrienti all'organismo indipendentemente dagli intervalli fra i pasti. Le [Registrazione disturbata] sono molteplici, adesso vedremo cosa comporta molto brevemente un deficit di funzione epatica. Il concetto molto importante è che come per tutti gli organi, il fegato ha una riserva funzionale molto ampia. Una resezione epatica anche estesa non determina una insufficienza epatica di per sé. Quello che può accelerare il quadro di deficit funzionale del fegato è la perdita dell'architettura, cioè un'alterazione strutturale del fegato indipendentemente dalla massa epatica può essere più dannoso di quanto non sia una perdita netta di tessuto. La condizione più tipica che si associa ad un totale sovvertimento dell'architettura epatica è la cirrosi epatica. La cirrosi epatica è una malattia comune. È determinata da processi infiammatori cronici a carico del parenchima epatico, la genesi può essere virale, tossica, per effetto dell'alcol, metabolica, per disturbi del metabolismo legati all'eccesso alimentare. Le manifestazioni sono l'irreversibile distruzione del parenchima associato a fenomeni di fibrosi. La funzione del fegato è quella di metabolizzare i composti che arrivano in forma elementare dalla mucosa intestinale attraverso il circolo portale, riassemblare proteine, lipoproteine, dismettere il glucosio attraverso le vene sur-epatiche [Termine incerto] sul circolo sistemico, quindi c'è un sistema sinusoidale negli spazi portali per cui arriva il sangue portale, va

all'epatocita, l'epatocita metabolizza poi dismette sulla circolazione sistemica. Un sovvertimento del rapporto architettonico tra circolo portale e circolo sistemico attraverso il processo di fibrosi è sufficiente a determinare un'inefficacia di questa capacità di metabolismo e sintesi. La stessa cosa vale per il versante escretivo, escretorio. Le sostanze che vengono metabolizzate che provengono dal circolo portale o anche dal circolo sistemico vengono metabolizzate dal fegato e vengono escrete per le vie biliari, non riescono ad essere escrete se non c'è un contatto fra cellula e canalicolo biliare. Quello che determina l'insufficienza del fegato è la creazione di una barriera fisica tra sinusoide, (sono sinusoidi ad ampia fenestratura, sono sinusoidi specializzati perché devono passare proteine ad alto peso molecolare e lipoproteine) e epatocita. Se si crea una barriera, attraverso un processo di fibrosi, e un'altra barriera dal versante adluminale verso il canalicolo biliare , la capacità dell'epatocita di raccogliere, metabolizzare e mettere in circolo oppure eliminare per via biliare le sostanze metabolizzate viene persa. Se si aggiunge a questo, fenomeni infiammatori con morte cellulare e disfunzione dell'epatocita, si ha un quadro estremamente complesso.

Alcune delle conseguenze dell'insufficienza epatica però non sono tanto di tipo metabolico, una grande insufficienza epatica sarebbe del tutto incompatibile con la vita, se il fegato non riesce a generare glucosio e lipoproteine, il periodo del digiuno diventa un periodo caratterizzato da brusche variazioni dei livelli glicemici. Se non assembla proteine che servono alla funzione della coagulazione o altro si hanno dei gravi difetti di funzione. Se arrivano sostanze che sono tossiche per l'organismo, ci sarà tossicità che è tipica dell'insufficienza epatica che porta a morte.

Al di là di questo, ci sono alcuni aspetti che sono tipici delle alterazioni di tipo fibrotico del fegato. Si ha un sistema vascolare capillare a bassa resistenza, con flussi a velocità molto bassa perché il circolo portale è quello venoso quindi a pressioni molto basse, [Registrazione disturbata] con compliance molto elevata, quindi resistenza al flusso molto basse, con un differenziale di pressione che va da una capillarizzazione periferica al circolo della cava inferiore, con differenziali di pressione idrostatica estremamente bassi. Quindi il flusso a basse pressioni passa attraverso il fegato attraverso un letto molto ampio di capillari che sono definiti sinusoidi proprio per questo aspetto lacunare che assumono molto spesso. Se si ha un processo di fibrosi la prima conseguenza in termini di variazione dell'emodinamica, quindi per ora consideriamo il fegato come struttura attraverso cui passano dei capillari, quello che si determina è un aumento della pressione idrostatica, per aumento delle resistenze intraepatiche. Se aumenta la pressione idrostatica a livello dei sinusoidi epatici, ci sarà un aumento della pressione idrostatica nel circolo portale, perché c'è un ostacolo a valle, un influsso di sangue che è determinato dal circolo arterioso mesenterico, capillarizzazione e poi circolo portale, risultato, c'è un aumento delle pressioni idrostatiche e dei flussi a livello del circolo portale. Questo ha due conseguenze principali. La prima è che l'aumento della pressione idrostatica determina una deviazione del flusso del circolo portale verso le aree anastomotiche, a livello del terzo distale dell'esofago, del fondo dello stomaco e del circolo emorroidario interno. Il differenziale di pressione verso il circolo sistemico è maggiore per cui il flusso devia verso il circolo sistemico attraverso un sistema di neovascolarizzazione in parte ma di estensione dei circoli collaterali preesistenti, con vasodilatazione delle vene dei circoli anastomotici, con pressione idrostatica più elevata, con aumento dei flussi, per cui una dilatazione con formazione di varici. Le varici esofagee, le emorroidi interne sono una tipica espressione di un aumento di pressione del circolo portale, di ipertensione portale.

La seconda conseguenza è un aumento volumetrico della milza, una terza conseguenza è diretta conseguenza dell'aumento di pressione idrostatica a livello del tratto capillare più prossimo alla capillarizzazione primaria quella che avviene a livello del distretto mesenterico. L'aumento della pressione idrostatica a questo livello determinerà fuoriuscita di acqua e soluti nell'interstizio. L'interstizio in cui sono contenuti i visceri addominali è in realtà una cavità, è un terzo spazio, è la

cavità peritoneale. Risultato: se aumenta la pressione idrostatica nel circolo portale si determina la formazione di ascite. L'ascite implica la raccolta di acqua e soluti trasudati, date le caratteristiche dei capillari, accompagnati da proteine, nel cavo peritoneale. Questo è un incremento con un guadagno senza fine perché non c'è un incremento contenibile finchè la pressione idrostatica nella cavità addominale non eguaglia o supera la pressione idrostatica del circolo portale. Siccome il circolo portale è nutrito dal circolo arterioso mesenterico, l'incremento di pressione per raggiungere l'equilibrio deve essere estremamente alto. Per cui non si ha virtualmente un limite per l'espansione della raccolta di acqua nella cavità addominale. L'accumulo di acqua che può determinare un quadro di questo tipo è estremamente massivo e determina poi la morte del soggetto per fenomeni di compressione quindi vengono compressi i vasi, compressi i reni, compresse le strutture del cavo addominale. Non solo, essendoci una contiguità abbastanza evidente con il cavo pleurico attraverso il circolo linfatico e le connessioni vascolari, si forma spesso anche un versamento pleurico. Quindi quello che si determina se aumenta la pressione idrostatica a livello dei sinusoidi epatici, si ha un'ipertensione portale, formazione di circoli collaterali estremamente evidenti, possono essere anche superficiali, non necessariamente profondi, c'è anche un circolo subcutaneo che bypassa il circolo portale anastomizzando il circolo della cava inferiore con quello della cava superiore, in più l'incremento volumetrico della milza e formazione di trasudato ricco di proteine (sinusoidi sono capillari fenestrati). Possibili conseguenze: da una parte nella milza si sequestrano maggiormente piastrine e globuli rossi perché si incrementa la funzione emocateretica della milza, dall'altra si ha la possibilità di rotture di vasi perché aumenta la pressione nelle vene. La pressione nelle vene può aumentare in modo gradativo perché sono pareti vascolari ad alta compliance, l'adattamento di tipo ipertrofico non c'è o è molto modesto, i tempi con cui si genera questo non determinerebbero neanche la possibilità di avere ipertrofia delle pareti, per cui [Registrazione disturbata] alta capacità, alta compliance e la parete sottile, la rottura vascolare è il rischio attuale. Il rischio emorragico è enormemente poi aumentato dal fatto che se c'è un fegato disfunzionante, la sintesi di fattori di coagulazione viene meno. Per cui si trova una condizione di rischio emorragico aumentata perché le piastrine diminuiscono per sequestro splenico, diminuiscono perché c'è uno stato flogistico cronico e perché tutto ciò si accompagna a un difetto dell'emostasi.

Il meccanismo con cui il guadagno di liquido nel cavo peritoneale e nelle cavità pleuriche ma dopo un po' anche nell'interstizio per cui compaiono edemi massivi, è un quadro che per certi aspetti ricorda lo scompenso cardiaco se non che primariamente compare un'ascite, mentre nello scompenso cardiaco un'ascite c'è spesso o quasi sempre ma assieme o dopo la formazione di edemi periferici, qui il processo va avanti in parallelo e la formazione di ascite è molto più spesso manifesta di quanto non siano gli edemi periferici, che tendono ad essere più tardivi. Come si genera questo? Per aumento della pressione idrostatica, i flussi arteriosi sul circolo mesenterico vengono mantenuti in queste condizioni aumentate, ipertensione portale, aumento della pressione, trasudazione, aumento della pressione nel distretto mesenterico, in più si associa un altro fattore, il fegato è la sede di sintesi dell'albumina, l'albumina viene prodotta in minore quantità se c'è la cirrosi, una diminuzione delle proteine del sangue, soprattutto dell'albumina, determina [Registrazione disturbata] Per cui si riduce la pressione oncotica e questo contribuisce da una parte a favorire ulteriormente la comparsa di ascite perché la perdita di pressione idrostatica e bassa pressione oncotica favorisce la fuoriuscita, dall'altra determina l'edema generalizzato. Una condizione di questo tipo è simile a quello che si determina nella sindrome nefrosica, dove compaiono gli edemi, cioè se si ha poca albumina, l'equilibrio idrostatico a livello dei capillari periferici viene alterato. Per cui a parità di pressioni idrostatiche non si ha capacità di recupero nel versante venulare dei capillari. Risultato: l'edema è senza termine e determina una perdita di volume efficace. Si attiva il sistema renina-angiotensina, si attiva il rilascio di vasopressina, l'aldosterone aumenta, in più se c'è un'insufficienza epatica c'è anche un'alterazione sul metabolismo degli ormoni steroidei per cui si ha un sistema che è molto spinto verso la ritenzione idrosalina. Tutto ciò contribuisce all'edema, alla perpetuazione dell'edema e dell'ascite. Quindi è

una condizione che per alcuni aspetti ricorda lo scompenso cardiaco con [Registrazione disturbata] dei sistemi sodio-ritentivi però si complica per il fatto che localmente, abbiamo un aumento nel distretto portale delle pressioni idrostatiche e in più abbiamo ipoalbuminemia, quindi nell'insieme i fattori convergono per determinare fuoriuscita di acqua e di soluti nella cavità peritoneale e nell'interstizio e in più in tutte le cavità sierose quindi il soggetto che abbia una condizione di cirrosi epatica va incontro ad un fenomeno che è presente anche nello scompenso cardiaco e nella sindrome nefrosica che si chiama stato anasarcatico, cioè si raccoglie acqua nel terzo spazio, nell'interstizio, in modo continuo, con una crescita senza fine finchè non determina la morte del soggetto. Gli incrementi ponderali possono essere di 20-30 Kg. La terapia diuretica riesce a compensare questo fenomeno perché determina una più rapida fuoriuscita di acqua e di soluto a parità di pressioni. Il meccanismo di compenso renale è l'unico che esiste quindi il guadagno viene un po' arrestato. Nel meccanismo sodio-ritentivo e idro-ritentivo interviene anche l'impossibilità di sviluppare ipertensione arteriosa perché nello scompenso cardiaco il cuore non pompa adeguatamente per far salire la pressione, qui invece si accompagna alla cirrosi una vasodilatazione generalizzata che è in parte legata all'alterato metabolismo degli ormoni steroidei, c'è un ipersteroidismo, ma soprattutto ci sono fenomeni di neoangiogenesi e di apertura di shunt per cui la pressione nel circolo sistemico e una vasodilatazione massiva legata a molti fattori anche l'NO prodotto in eccesso, per cui la pressione arteriosa tende ad essere bassa. Essendo bassa la pressione arteriosa il compenso renale diventa inefficacie quindi può essere mantenuto solo attraverso l'uso di farmaci come i diuretici che facilitano l'uscita di acqua e di sodio. Quindi la situazione che si determina è complessa ed ha almeno tre capisaldi, da tenere presenti perché sono quelli su cui si può intervenire e che permettono la comprensione della fisiopatologia dell'ascite e dell'edema nell'insufficienza epatica, soprattutto nella cirrosi.

Domanda: chiarimento sulla vasodilatazione sistemica.

Risposta: la vasodilatazione sistemica è multifattoriale, in parte è alterato il metabolismo degli ormoni in buona parte c'è un aumentato tono vasodilatante periferico e in più c'è una componente di neovascolarizzazione, neoangiogenesi attraverso l'apertura di shunt arterovenosi, attraverso l'apertura di circoli collaterali. Uno dei fenomeni che caratterizzano la cirrosi è la comparsa dei cosiddetti spider-nevi, sono degli angiomi che sono l'espressione proprio della neovascolarizzazione che si genera e poi c'è un'ampia apertura di shunt per cui il circolo ad alta velocità a bassi volumi perché c'è ipoalbuminemia quindi la pressione tende ad essere bassa per la generalizzata vasodilatazione che è caratteristica della cirrosi. I soggetti con cirrosi, anche in presenza di basse pressioni, hanno un circolo cutaneo molto dilatato, mani calde e rosee per un eccesso di vasodilatazione non controllata.

Domanda: qual è la causa di queste alterazioni?

Risposta: è un processo flogistico cronico, è un processo in cui c'è uno stato di sepsi subclinica, necrosi subclinica e in più un alterato metabolismo di ormoni e di sostanze vasodilatanti e in più uno stimolo angiogenico per questo la cirrosi epatica evolve spesso verso malattie di tipo neoplastico.

Domanda: quindi non c'è un compenso renale?

Risposta: non c'è un compenso renale perché il rene può compensare, ma non avendo un determinato incremento di pressione, come nello scompenso cardiaco, si determina ritenzione idro-salina. Non solo, questi meccanismi di cui vi ho parlato di malregolazione dei flussi distrettuali per cui anche con ipotensione si hanno mani calde con vasodilatazione cutanea, che è il primo tessuto che viene deprivato di circolo nel caso di ipotensione, si determinano anche degli squilibri nel

circolo distrettuale per cui tipicamente nella cirrosi si ha la tendenza ad andare incontro a fenomeni di ipoperfusione renale. Il meccanismo è complesso e solo in parte spiegato. Comunque sia, la capacità di autoregolazione del flusso renale è persa molto facilmente e si determina molto facilmente quella che si chiama, sindrome epato-renale. Vuol dire che in una condizione di insufficienza epatica, si determina una insufficienza renale. I meccanismi che [Registrazione disturbata] molto spesso sono bassa pressione efficace nel circolo in più una incapacità di autoregolazione e in più, come succede spesso nei processi infiammatori, locale produzione di fattori vasocostrittori oppure alterata condizione dei vasodilatanti come l'NO. La sindrome epato-renale è una complicazione importante ed è proprio espressione di questa incapacità di regolazione del circolo sistemico.

Vediamo cosa si accompagna ad una insufficienza epatica da un punto di vista metabolico. Nell'insufficienza epatica, nelle fasi iniziali, le alterazioni del metabolismo glucidico sono molto varie nel senso che, molte condizioni che portano alla cirrosi epatica, sono condizioni che di per sé portano ad un'iperglicemia. La steatosi epatica nel soggetto obeso o etilista è spesso accompagnata da una tendenza all'iperglicemia, perché c'è una maggiore gluconeogenesi. Tuttavia, se si riduce la massa epatica, quello che si manifesta è un'incapacità di avere un adeguato accumulo di glicogeno, dall'altra una spiccata riduzione della capacità di regolare [Termine incerto] la gluconeogenesi. In una fase iniziale c'è una condizione che può favorire un'iperglicemia ma nelle fasi più avanzate si riduce la capacità di generare glucosio (la figura va divisa in tappe altrimenti non è comprensibile) e avendo una persistenza di insulina in circolo, la tendenza all'ipoglicemia. Quindi inizialmente prevale una condizione che è simile a quella della sindrome metabolica della condizione di diabete. Se si ha un danno epatico molto esteso, l'insufficienza di numero e di dimensione degli epatociti determina ridotta gluconeogenesi e quindi tendenza all'ipoglicemia, soprattutto a digiuno. L'azione dell'insulina determina ipoglicemia. Si può anche avere glucagone in eccesso ma non c'è capacità di sintesi. C'è poco glicogeno, quindi le riserve funzionali in dismissione di glucosio sono ridotte. Il risultato è la tendenza all'ipoglicemia. Si manifesta nelle fasi più avanzate, quelle preterminali dell'insufficienza epatica, con persistente ipoglicemia, molto grave, che può essere corretta solo in parte dall'alimentazione perché l'alimentazione determina il rilascio di insulina e quindi precipita nuovamente l'ipoglicemia. Può essere corretta solo da somministrazione continua di glucosio endovena in modo da avere una glicemia basale determinata non dall'organismo, ma dall'esterno. Ipoglicemia a livello del SNC vuol dire mancanza di energia per il neurone e quindi coma ipoglicemico che è una delle cause che determinano la morte nell'insufficienza epatica.

Un altro aspetto importante è l'alterazione del metabolismo degli aminoacidi. Gli aminoacidi sono assorbiti dopo la digestione intestinale a livello della mucosa intestinale, passano nel circolo portale e dopo avviene una risintesi proteica nei tessuti. La sintesi epatica è molto importante perchè quasi tutte le proteine del sangue, prima fra queste l'albumina, sono prodotte dal fegato e quindi un alterato metabolismo epatico determina un deficit di sintesi proteica. Anche il metabolismo di sintesi degli aminoacidi è alterato e soprattutto è alterato anche il ciclo dell'urea. Risultato: si ha un accumulo di ammoniaca. L'ammoniaca ha un riciclo attraverso un circolo entero-epatico, alti livelli di ammoniaca, e verosimilmente di altre sostanze che ugualmente seguono il circolo entero-epatico, determina una disfunzione neuronale e quindi quella che si chiama l'encefalopatia epatica. L'ammoniaca può essere ulteriormente un determinante dell'azione della sintesi di neurotrasmettitori e può essere quindi causa dell'encefalopatia epatica ma su questa pesano anche molti altri fattori. L'ammoniaca è un buon indice di alterato metabolismo e funzionalità epatica. Ovviamente dipende molto non solo dalla sintesi attraverso la degradazione aminoacidica a livello intestinale ma dipende anche molto dall'apporto proteico e aminoacidico per cui è molto dieta dipendente. In pazienti con insufficienza epatica, un elevato introito di aminoacidi può scatenare una condizione di encefalopatia epatica per accumulo di sostanze come l'ammoniaca e

probabilmente altri metaboliti del metabolismo aminoacidico. Quindi iperammoniemia e bassa produzione di urea.

DEFICIT DI SINTESI PROTEICA

Il deficit di albumina determina conseguenze emodinamiche, determina un quadro che è del tutto sovrapponibile a quello della sidrome nefrosica. È una condizione del tutto simile anche a quella che si determina nelle gravi malnutrizioni. Nei bambini denutriti l'aspetto che colpisce di più oltre alla magrezza da deficit muscolare è l'addome molto disteso. L'addome è disteso perché c'è ascite, il deficit di aminoacidi e il deficit proteico determinano un danno epatico primario e contribuiscono notevolmente alla formazione dell'ascite.

Le proteine del sangue compresa l'albumina sono anche proteine di trasporto, quindi il metabolismo e l'escrezione anche per via renale di alcune sostanze può essere alterato.

Il fegato è la sede di sintesi di tutti i fattori della coagulazione tranne del fattore VIII. C'è una quota di questi che sono vitamina K dipendenti, e una quota che sono vitamina K indipendenti. Quando c'è un'insufficienza epatica il difetto di sintesi è indifferenziato, quindi anche il fibrinogeno si riduce molto, il fibrinogeno molto spesso viene usato come spia del deficit di sintesi epatica. L'albuminemia è anche spia di un deficit di sintesi epatica. Il difetto coagulativo è complesso perché tutti i fattori tranne l'VIII sono di origine epatica, quindi il quadro di diatesi emorragica che si determina è estremamente grave ed è linearmente correlato con [Registrazione disturbata] di sintesi e dismissione dei fattori di coagulazione. Se c'è una condizione di basso assorbimento della vitamina K, come può accadere nell'insufficienza epatica, si somma al difetto di sintesi, anche un difetto di carbossilazione dei fattori vitamina K dipendenti.

LIPIDI

Nell'insufficienza epatica compare un'alterazione complessa del metabolismo lipidico. Come per il glucosio, nelle fasi iniziali spesso prevalgono, anche perché questi sono i meccanismi che stanno a monte, fenomeni di aumento del contenuto di lipoproteine in circolo. La steatosi epatica è spesso su base metabolica (eccessi alimentari), è possibile che all'inizio si determini una condizione di non variazione o incremento delle lipoproteine circolanti, però quello che è caratteristico nel tempo è l'incapacità di un assemblaggio delle VLDL e una progressiva riduzione, via via che si riduce la massa epatica funzionante, dei livelli di colesterolo in circolo. Per cui il livello di colesterolo nell'insufficienza epatica è una spia diretta delle capacità funzionali del fegato. Se è molto basso, è un indice di bassa funzionalità epatica. Ci sono alcune condizioni anche di cirrosi in cui l'alterazione delle lipoproteine è molto marcata però senza difetto, anzi spesso con una ipercolesterolemia, con cirrosi biliare primitiva perché, se ci sono fenomeni ostruttivi sulle vie biliari, l'escrezione biliare dei sali biliari, quindi il metabolismo del colesterolo, è alterato, per cui si tende ad avere, non solo per questo motivo ma anche accompagnato a questo, un'ipercolesterolemia. Sono condizioni minoritarie rispetto alla condizione prevalente che è quella di una iniziale alterazione che può essere legata alle condizioni metaboliche preesistenti ma poi progressiva riduzione delle lipoproteine dismesse dal fegato, quindi VLDL e quindi lette molto bene dai livelli di colesterolo.

I livelli di trigliceridi seguono un pochino la stessa logica, cioè nelle fasi iniziali e nelle più tardive tendono ad essere più alti, spesso per le condizioni predisponenti, o per l'alterata dismissione delle lipoproteine, come si ha nella cirrosi biliare primitiva, però nel tempo la quota tende a ridursi.

ORMONI

Il fegato è sede di un'elevata capacità di modificare la struttura chimica di composti come gli ormoni, i farmaci, questo attraverso il sistema metabolizzante i farmaci e il sistema istotropico [Registrazione disturbata] Attraverso una serie molto varia di reazioni ossido-riduzione, idrossilazione, eliminazione, metilazione e processi di coniugazione che permettono di trasformare una sostanza liposolubile in una sostanza idrosolubile e permettere quindi l'eliminazione per via renale oppure per via epatica.

Molti ormoni subiscono alterazioni nel loro metabolismo epatico, gli estrogeni, l'aldosterone, il testosterone, per cui si hanno nell'insufficienza epatica anche variazioni nella concentrazione relativa di alcuni ormoni. L'iperestrogenismo, da decenni è considerato come una dei meccanismi che portano alla vasodilatazione cutanea e alla relativa vasodilatazione (non è l'unico meccanismo) che caratterizza la cirrosi epatica. Comunque contribuisce anch'esso all'apertura di shunt arterovenosi, a quei fenomeni di neoangiogenesi che si manifestano tipicamente con la comparsa di lesioni cutanee che sono gli angiomi, spider perché hanno un aspetto finemente ramificato. A tutto questo può dare un contributo ulteriore il fatto che nell'insufficienza epatica la escrezione biliare è spesso alterata perché se si ha un processo di fibrosi questo non coinvolge soltanto i sinusoidi epatici, ma anche i canalicoli biliari e quindi fenomeni ostruttivi intraepatici complicano ulteriormente il quadro che si determina in un'insufficienza epatica.

Mettendo insieme tutti i dati, se si ha un'insufficienza epatica, soprattutto negli stadi più avanzati, la compatibilità con la vita è molto bassa, come per l'insufficienza renale, come per quella cardiaca però sono processi che passano attraverso gradi molto distanziati, è un processo lento che evolve negli anni, per cui la capacità di compenso relativo permette un'esistenza pur con dei rischi di complicazione. L'insufficienza epatica in una fase avanzata presenterà sicuramente:

- Ascite ed edema, perché molto spesso se il processo è acuto e non si accompagna ad un processo di fibrosi l'ascite e l'edema non fanno in tempo a comparire però se c'è ipoalbuminemia l'ascite compare.
- Ipotensione e tachicardia perché c'è un circolo vasodilatato con basso riempimento perché c'è ipoalbuminemia, quindi bassa pressione, basso volume efficace
- Eritema palmare
- Spider nevi
- Ginecomastia per effetto degli estrogeni in eccesso
- Amenorrea secondaria nelle donne
- Anemia dovuta all'aumento di volume della milza, sequestro splenico, relativa inibizione del processo flogistico che l'accompagna
- Ipoglicemia a digiuno, tipica manifestazione tardiva e grave dell'insufficienza epatica
- Insufficienza renale, cosiddetta sindrome epato-renale con dei meccanismi che sono quelli dell'alterata perfusione ma anche della compressione per la presenza di liquidi ascitico e basso riempimento vascolare
- Alterazione dello stato di coscienza legata all'encefalopatia e in alcuni casi all'ipoglicemia che poi porta al coma epatico. Il coma epatico può essere reversibile se di tipo metabolico, spesso è un segno di avanzamento notevole della malattia
- Ittero

ITTERO

L'ittero è una spia clinica nota dall'antichità di uno stato di malattia epatica o di un alterato metabolismo epatico. È l'accumulo a livello dei tessuti, per cui diventa visibile attraverso la cute e attraverso le mucose, della bilirubina. La bilirubina è il prodotto di degradazione dell'eme, viene generata quindi in modo continuo attraverso il catabolismo dei globuli rossi nel midollo, nella

milza, negli organi emocateretici, compreso anche il fegato. Quindi è un processo che normalmente è in equilibrio tra sintesi e metabolismo. Quando c'è un'alterazione tra rapporto di sintesi di eme e il suo metabolismo, si determina necessariamente l'ittero cioè un accumulo di bilirubina. La bilirubina è una porzione dell'eme privata del ferro. Passa attraverso una serie di modificazioni strutturali, è il prodotto relativamente terminale, è derivato dall'emeossigenasi ed è lipofila nella sua struttura originale per cui una volta che sia liberata dalla struttura della proteina, dall'emoglobina, viene trasportata in circolo principalmente dall'albumina, poi dopo arriva negli organi idrobolizzanti [Termine incerto] principalmente nel fegato dove viene modificata strutturalmente attraverso un processo di glucuronazione. Quindi passa attraverso una [Registrazione disturbata], una coniugazione e poi diventa idrosolubile. Una volta divenuta idrosolubile la bilirubina coniugata viene eliminata per via biliare. L'escrezione biliare dà luogo ad un circolo entero-epatico che porta dei prodotti che vengono eliminati per via renale. Se la concentrazione di bilirubina coniugata è molto alta, la bilirubina coniugata compare anche nelle urine. Quindi escrezione biliare prevalente, piccola concentrazione ematica, nel caso ci sia un'alterazione nel processo di escrezione, la bilirubina coniugata aumenta in circolo e può comparire nelle urine. La bilirubina subisce una degradazione a livello intestinale e poi dopo una eliminazione attraverso il circolo entero-epatico nuovamente per via renale. questo sistema fa si che la bilirubina sia diventata, già decenni fa, un biomarcatore per seguire il processo di degradazione dell'emoglobina e dall'altra il processo di eliminazione. È visibile molto facilmente, persone che hanno un aumento della bilirubina in circolo diventano gialle.

Abbiamo una condizione di emolisi eccessiva che può essere data dalla distruzione dei globuli rossi nel midollo in alcune emoglobinopatie, la talassemia per esempio. Oppure è dovuta ad un eccesso di distruzione in circolo, i globuli rossi si frammentano per un meccanismo immunomediato o di alterato equilibrio di sopravvivenza cellulare, perché ci sono difetti del metabolismo, condizioni di stress ossidativo, un difetto di glucosio fosfato deidrogenasi e ci sarà un'emolisi intravascolare, oppure malattie autoimmunitarie con meccanismi di emolisi immunomediata, oppure trasfusioni, traumi diretti possono determinare un eccesso di emolisi. Tutte queste condizioni determinano un aumento dell'emoglobina in circolo, demolizione dell'emoglobina, produzione di bilirubina non coniugata che quindi è presente in circolo. La bilirubina non coniugata, detta bilirubina indiretta, una volta che arriva al fegato deve essere sottoposta a tutta una serie di processi. La presenza di bilirubina indiretta, potrebbe essere spia anche di un difetto di captazione da parte del fegato oppure di un difetto di glucurunazione e comunque in questi casi c'è un aumento di bilirubina indiretta. Nell'insufficienza epatica, nella cirrosi, può esserci un aumento della bilirubina indiretta perché il fegato non è in grado di metabolizzarla. Questo avviene in modo parafisiologico in tutti i bambini che nascono pretermine perché, al di là dell'emolisi che può seguire la fase successiva al parto, hanno una sintesi normale ma c'è un difetto di captazione e coniugazione, per cui l'aumento della bilirubina indiretta determina l'ittero neonatale. È pericolosa perché essendo liposolubile, quando la sua concentrazione aumenta nei tessuti e quindi nelle cellule del SNC in maniera considerevole con una soglia di tossicità grave sopra i 20 mg/dl, si determina una necessità di eliminare la bilirubina indiretta con la fototerapia con lampade a ultravioletti si può demolire attraverso una lisi protochimica la bilirubina e quindi renderla non tossica.

Se abbiamo un'insufficienza epatica abbiamo una cirrosi, abbiamo un'ostruzione dei canalicoli biliari intraepatici, si avrà tendenza anche al difetto di escrezione quindi la quota di bilirubina coniugata che non viene escreta è sicuramente presente. Però se si ha un'ostruzione extraepatica, il fegato funziona ma sono ostruite le vie escretrici ad esempio le vie biliari principali, si avrà un incremento puro di bilirubina coniugata, la bilirubina cosiddetta diretta. La stessa cosa può accadere anche nelle patologie flogistiche dei dotti però in presenza di una normale funzionalità epatica. In questi casi anche che siano intraepatici come la presenza di una cirrosi biliare oppure nei [Registrazione disturbata] ma che occludono i vasi biliari anche più fini però c'è una normale

funzionalità epatica, la bilirubina sarà integralmente coniugata perché il fegato è in grado di metabolizzare tutta quella che arriva dal circolo sistemico e non è in grado di dismetterla nel circolo biliare e quindi aumenta la forma coniugata. Idrosolubile, minore tossicità. Aumentando in circolo, compare nell'urina, cosa che normalmente non avviene perché la quota escreta nelle urine è molto poca.

Lezione di Patologia generale e fisiopatologia clinica (sem2) del 20/5/2013 (1)

Lezione di Patologia generale e fisiopatologia clinica (sem2) del 20/5/2013

Prof. Cassatella
Sbobinatore: Varalta Anna
Revisore: Laura Galassi

La registrazione non include i primi minuti di lezione: riporto quindi i miei appunti.
Il professore riprende gli ultimi concetti della lezione precedente riguardanti il processo metastatico.

Slide: "Figura 1"

La slide mostra le tappe principali che possono portare all'evento metastatico.

La metastasi rimane tuttavia un processo inefficiente: anche se il tumore ha cellule che hanno acquisito le potenzialità necessarie per dare metastasi, la probabilità che il processo metastatico vada in porto sono praticamente pari a zero.

Slide:"Figura 27.28"

La figura mostra la cellula potenzialmente metastatica, gli eventi e le difficoltà che essa deve superare perché il processo metastatico abbia successo.

Una volta che la cellula giunge nel circolo sanguigno (*il prof poi quando commenta l'elenco sottostante si riferisce ad eventi, quali l'intervento del SI, che possono accadere anche precedentemente all'entrata in circolo ndr*) accadono una serie di eventi che possono esserle favorevoli o sfavorevoli:

- l'intervento del sistema immunitario (SI), innato e specifico. Può incontrare cellule killer (NK ? vedi slide) durante il viaggio verso il capillare.

- il potenziale legame di Ig, al quale può accompagnarsi la lisi da parte del complemento
- l'uccisione nel circolo sanguigno da parte dei linfociti citotossici
- Può essere ricoperta da piastrine, che possono fornire fattori di crescita alla cellula tumorale. La cellula o le cellule possono ricoprirsi di piastrine e così facendo esse si difendono dall'attacco del SI a tutti i suoi livelli. Questo è solo uno dei meccanismi che la cellula tumorale mette a punto ai fini del processo di IMMUNE ESCAPE
- Passaggio attraverso il cuore: qui la cellula a causa della turbolenza potrebbe morire
- *Incomprensibile* passaggio attraverso i capillari polmonari: anche questo risulta un ostacolo al proseguimento del cammino di questa cellula
- Esposizione a concentrazioni tossiche (elevate) di O_2 nel circolo polmonare
- Ritorno alla circolazione sistemica: una volta giunta qui potrebbe TEORICAMENTE metastatizzare in ogni distretto per formare un tumore II, la probabilità dovrebbe essere uguale, ma non è così.
- Sempre nel circolo, altri eventi possono arrestare il percorso della cellula: *incomprensibile* la cellula si va a "sfracellare" nei capillari oppure può arrestarsi. Se si arresta non è detto che il processo continui, infatti essa può morire. Al contrario, se essa trova un ambiente favorevole, può moltiplicarsi in sede vasale o extravasale e moltiplicarsi al di fuori del vaso. (*concetto ripreso successivamente ndr*)

Slide:" Figura 5"

Questa figura mostra la probabilità di successo della metastasi.

(*Il professore commenta che la slide in realtà riporta percentuali sbagliate. Ad esempio afferma che la percentuale riferita alla figura di destra (99.98%) non è giusta, dovrebbe essere 99.98 all'infinito cioè 0. Non so cosa voglia intendere con ciò e come sia possibile tale risultato, riporto ciò che lui ha commentato per correttezza)*

La figura vuole quindi mostrare che il processo della metastasi diventa sempre più difficile mano a mano che va avanti. Infatti anche se la cellula giunge a destinazione vi è una probabilità altissima che il tumore II <u>non</u> si formi.

Slide:" Figura 2"

La figura vuole indicare il rapporto del tumore con lo stroma, il microambiente. Esso può generare meccanismi con cui può favorire questa cascata.

Legge didascalia: a livello locale la progressione metastatica non rappresenta esclusivamente un processo autonomo, della sola cellula tumorale, ma può essere influenzato dal microambiente che può aiutare ciascuno degli step della cascata che produce invasione locale, infiltrazione e metastasi.

Ad esempio, a livello locale:

- Le cellule stromali possono favorire la produzione di proteasi, che permettono l'infiltrazione degradando la matrice extracellulare, il collagene, le proteine della membrana basale.
- le cellule stromali possono produrre fattori di crescita, come il CSF1

- le piastrine possono ricoprire la cellula tumorale e proteggerla dal SI (NB: ciò ovviamente avviene nel sangue)
- avviene la produzione di mediatori che possono favorire l'extravasazione, l'attecchimento a livello locale e la formazione delle cosiddette MICROMETASTASI, perché l'ambiente produce fattori di crescita e metalloproteasi.

Slide:" Figura 9.1"

Affinché la cellula neoplastica possa <u>potenzialmente</u> metastatizzare, essa deve acquisire una serie di caratteristiche, che sono qui elencate e che sono state trattate nella lezione precedente.

Il tumore I è composto da una serie cellule derivate inizialmente da un unico clone, ma che durante lo sviluppo possono acquisire caratteristiche diverse.

Le cellule che hanno le seguenti proprietà possono iniziare il processo metastatico.:

- diminuita adesività omotipica
- *incomprensibile* (vedi slide, a sx)
- aumentata capacità di movimento
- aumentata capacità di secernere enzimi litici
- aumentata capacità di esprimere proteasi di membrana
- aumentata capacità di esprimere recettori per la laminina e la fibronectina (non sono sicura, ma è tutto sulla slide ndr)
- *incomprensibile* di contatto
- resistenza al SI

Tuttavia queste non sono teorie assolute, ve ne sono anche altre. (*non ha specificato quali ndr*)

Slide successiva:

La dimostrazione che nella massa tumorale coesistono cellule che hanno proprietà fenotipiche differenti e che quindi hanno diverse potenzialità metastatiche è illustrato in questo esperimento: viene iniettato un melanoma, si prelevano alcune cellule, si fa una coltura e varie sottocolture. Si clonano i vari tipi di cellule, queste si vanno a inoculare in topi singenici e si nota che le cellule dei vari cloni derivati dal tumore I hanno capacità diverse di dare metastasi.

Se il tumore I da cui faccio il prelievo iniziale è già metastatico e faccio cloni, le cellule che derivano dalle metastasi sono in grado di dare metastasi nel nuovo topo in modo molto efficiente e omogeneo. La cellula che giunge a dare metastasi è quindi molto efficiente nello svolgere questo processo.

Slide:” Figura 1”

La slide mostra che, mano a mano che la cellula diventa sempre più maligna, diminuisce il tempo necessario a dare metastasi.

Ad esempio, cellule di un tumore I impiegano 12 anni; cellule tumorali provenienti da una sede di metastasi I per darne una seconda impiegano 31 mesi, se è di una metastasi II ci mettono 30 giorni.

Più la cellula tumorale progredisce più acquista malignità e questi processi si accelerano.

Slide:” Figura 4”

Quanto detto nella frase precedente è teorico, ci sono infatti eccezioni alla regola. Sono stati svolti studi sulla capacità di dare metastasi in tumori diversi (carcinoma della mammella, del polmone, del colon retto). Vi sono stati risultati diversi:

Caso 1= l’acquisizione delle capacità è rapida, ma prima che la metastasi abbia luogo c’è un PERIODO DI LATENZA molto lungo, anche di decadi.

Caso 2(adenocarcinoma del polmone)= questo tumore è molto maligno, in quanto può dare metastasi con periodo di latenza minimo o nullo

Caso 3 (carcinoma del colon-retto)= necessita di molto tempo (anni) per acquisire la capacità metastatica, ma una volta acquisita la formazione di metastasi avviene velocemente.

Le due slide successive le guardiamo da soli

Slide:”Fattori dell’ospite che condizionano lo sviluppo della metastasi”

Essi sono:

- circolazione dell’organo(*sede di tumore I ndr*): se questo è molto vascolarizzato favorisce la disseminazione per via ematica.
- movimenti degli organi: il movimento del muscolo, ad esempio, può ostacolare l’impianto di una cellula metastatica.

- capacità del SI di combattere le cellule tumorali, ovviamente diminuita negli immunodepressi.
- capacità di produrre una risposta flogistica contro il tumore, qui intesa come ruolo negativo nello sviluppo e nella metastasi tumorale, ma sappiamo che la flogosi può avere un ruolo pro tumorale in base alla fase di sviluppo del tumore in qui avviene.
- Caratteristica delle cellule endoteliali che possono avere più o meno affinità per le cellule tumorali

Domanda: Cosa significa quest'ultima affermazione?

Riposta 1: l'endotelio ha un pattern chemochimico adeguato ai recettori presenti sulle cellule tumorali (*lo studente si riferisce ad un concetto che il professore ha spiegato nella lezione del primo semestre dedicata alle chemochine ndr*)

Risposta 2: l'endotelio esprime adeguate molecole di adesione

Il professore conferma la seconda risposta, la prima riguarda il concetto di metastasi preferenziale che spiegherà successivamente. La risposta uno non è sbagliata secondo lui.

L'arresto della cellula potenzialmente metastatica è quindi condizionato da interazioni con l'endotelio, con le sue molecole di adesione.

- Capacità di produrre fattori angiogenetici che favoriscano la vascolarizzazione del tumore, sia del tumore I che delle sue metastasi
- *Incomprensibile* (ultimo punto della slide)

Slide:"Fasi…"

Diverse sono le gli eventi che porteranno le cellule del tumore primario a dare metastasi.

SI IPOTIZZA che in un tumore maligno I (es: carcinoma):

- Fase 1: Vi siano cellule con fenotipo potenzialmente metastatico
- Fase 2: avvenga il distacco delle suddette dal tumore I dovuto, ad esempio, a *incomprensibile* , diminuzione dell'adesività omotipica, aumento delle cariche negative con conseguente diminuzione della capacità di aggregarsi (le cellule di respingono)
- Fase 3:la cellula superi la membrana basale e invada i tessuti adiacenti

  Questo è un processo difficile e regolato da una parte dalla capacità della cellula tumorale di esprimere, produrre e secernere proteasi e dall'altra dalla capacità dello stroma di produrre antiproteasi. Il bilancio deve quindi essere a favore delle proteasi (di membrana o solubili)

Tabelle 9.7, 9, 13.1ïƒ professore legge qua e là, le dobbiamo guardare da soli. Dice di guardare bene le proteasi e i loro bersagli nella ECM. Dice che non vuole sapere tutto, ma in particolare ricordare le famiglie di proteasi che possono essere prodotte dalle cellule tumorali.

Tra le varie strategie terapeutiche anticancro sono in studio inibitori di proteasi

Tabella successiva: prof si focalizza su METALLOPROTEASI 2-3-9-10, ATTIVATORE DEL PLASMINOGENO, GELATINASI, relativi bersagli

Slide:"Figura. "

Studi dimostrano che esiste una correlazione fra grado di malignità di diversi tumori (es: melanomi, astrocitomi) e capacità di produrre attivatore del plasminogeno (che degrada le proteine della matrice) e di esprimere il recettore corrispondente.

Se l'attivatore del plasminogeno si lega al recettore la cellula è stimolata a muoversi.

Slide successiva

Le proteasi, grazie alla loro capacità di degradare le proteine della ECM, quelle della membrana e basale e del tessuto, favoriscono l'infiltrazione; possono degradare le molecole di adesione della cellula tumorale; INOLTRE le proteasi possono degradare componenti atti ad inibire fattori di crescita e citochine, che dopo essere stati prodotti dall'ambiente, sono rilasciati così in forma inattiva(es. alcuni membri della famiglia del TGF): se degrado il complesso inibitorio rilascio il fattore di crescita in forma attiva.

Slide successiva

Dopo il distacco e l'infiltrazione, negli ultimi anni è stata scoperta la TRANSIZIONE EPITELIO-MESENCHIMALE (EMT).

E' il processo secondo cui le cellule epiteliali cambiano il proprio fenotipo in mesenchimale. Questo avviene quando la cellula invade il tessuto connettivo ed è un processo reversibile. Una volta data la metastasi, avviene infatti il processo inverso (TRANSIZIONE MESENCHIMO-EPITELIALE).

L'EMT Avviene inoltre fisiologicamente durante lo sviluppo embrionale e l'infiammazione.

A cosa serve?

La finalità non è unicamente quella di favorire la migrazione nel connettivo grazie al cambiamento di forma, ma in questo modo la cellula tumorale vuole farsi riconoscere come cellula simile, “amica” da quelle del mesenchima.

Ne acquisisce il fenotipo, le proprietà funzionali, l’espressione di recettori e di molecole di adesione. Essa vuole “mascherarsi” per interagire con le cellule del tessuto connettivo, al fine che non ostacolino il processo metastatico, anzi lo favoriscano.

Slide:” Figure 1”

Illustra le caratteristiche del fenotipo mesenchimale

Slide:”Figure 5”

Illustra il processo dell’EMT nel carcinoma.

Dall’epitelio normale si sviluppa un carcinoma in situ, le celllule subiscono la EMT , infiltrano il tessuto, migrano in esso, giungono ai vasi e vi penetrano. Giunte al luogo di metastasi, subiscono il processo inverso e danno il tumore II.

Slide successiva

Dopo l’EMT le cellule risultano di forma allungata ecc ecc (vedi slide)

Slide successiva

Numerosi sono gli studi per chiarire l’aspetto molecolare del processo della transizione epitelio mesenchimale.

Questo processo pare correlato a citochine (es: fattori di crescita) prodotte dalle cellule stromali (fibroblasti, macrofagi, cellule infiammatorie) che attivano un programma genico caratterizzato da vie di trasduzione varie che attivano fattori di trascrizione nella cellula tumorale.

I nuovi geni espressi le fanno acquisire quindi sembianze mesenchimali.

Slide:”tabella 14.2”

Illustra gli eventi cellulari correlati all’EMT:

- Perdita dell’espressione di citocheratina (marcatore delle cellulle epiteliali)
- Perdita dell’espressione delle E-caderine (E=epiteliali)
- Perdita della polarità delle cellule epiteliali
- Acquisizione delle N-caderine (caderine di tipo mesenchimale)
- Acquisizione di forma fibroblastica
- Acquisizione di motilità
- Acquisizione di invasività
- Acquisizione di capacità di secrezione di proteasi
- Espressione di un programma genico di tipo mesenchimale

Slide successiva

La cellula tumorale che va incontro a EMT, cambia quindi l’espressione delle caderine da E a N.

In questo modo essa può interagire con le cellule mesenchimali, quali fibroblasti e cellule endoteliali: ciò favorisce la sopravvivenza e il movimento in questo nuovo microambiente.

Slide successiva

Inoltre è importante ricordare un concetto che abbiamo trattato parlando degli oncosoppressori. A livello molecolare, la perdita di E-caderina fa si che il complesso della beta catenina liberi APC. Questo porta all’espressione di un nuovo programma genico, grazie alla traslocazione di fattori di trascrizione nel nucleo.

Slide successiva: va veloce

Slide”figura 2”

Oggi è molto studiato il ruolo della CELLULA STAMINALE nella trasformazione neoplastica

Grazie all’EMT le cellule tumorali possono acquisire caratteristiche proprie delle cellule staminali. Le cellule staminali sono cellule molto indifferenziate e ciò rende quindi le cellule tumorali sempre più maligne e in grado di interagire sempre di più con le cellule del connettivo

Fenotipi di più cellule diverse si mescolano quindi mano a mano che la cellula avanza nel processo metastatico

Slide:” At a glance”

Riassunto di quanto detto prima.

- La EMT sottolinea la plasticità delle cellule epiteliali e contribuisce alla progressione tumorale e allo sviluppo dell'eterogeneità fenotipica nella massa tumorale
- La EMT è correlata a stimoli vari (interazioni con cellule stromali, ipossia, mediatori, segnali derivati da GF)
- Vi è un crosstalk fra segnali che inducono la EMT e fattori di trascrizione che riprogramma stabilmente la cellula tumorale da epiteliale a mesenchimale
- La EMT porta la cellula cancerogena ad acquisire proprietà delle cellule staminali, proprietà che le permettono di invadere in tessuto circostante e una maggiore resistenza ad inteventi terapeutici
- L' EMT è un processo reversibile
- L' EMT può essere correlata all'attivazione di miRNA

Slide:"figura 6.11" e slide "figura 27.33"

La cellula tumorale che infiltra deve acquisire o aumentare la capacità di muoversi. Inoltre nel micorambiente devono esserci segnali che favoriscano la colonizzazione e favoriscano il percorso che essa deve fare.

Alcuni tumori sono in grado di produrre in maniera autonoma dei <u>fattori autocrini di motilità</u> (es: lipidi)

Slide:

Riprendendo le fasi del processo metastatico, la fase 4 è la <u>penetrazione nel capillare ematico o linfatico.</u>

Inoltre altre sono le potenziali vie di metastasi. La cellula tumorale può infatti giungere in:

- <u>cavità preformate</u>(ad esempio tumori dello stomaco o dell'intestino possono dare metastasi al peritoneo in quanto le cellule invadono la parete dell'organo e poi "cadono" nel peritoneo. Inoltre una comune sede di metastasi per il carcinoma dello stomaco sono le ovaie)
- <u>aree di contiguità</u> (in un organo vicino) *NB: per definizione non vi è continuità anatomica fra il tumore I e la metastasi. Si intende qui la sola vicinanza anatomica dei siti di innesto del tumore I e II*

Slide:"figura 27.9"

Il processo di penetrazione dei vasi non è un processo facile. Un tumore con cellule a potenziale metastatico ha cinque possibilità per riuscire a penetrare la parete vasale:

1. la massa tumorale infiltra <u>direttamente</u> la venula forzandola

2. singole cellule si staccano dal tumore I e infiltrano il vaso
3. la massa rilascia cellule tumorali in lacune vascolari prive di rivestimento endoteliale. Questo si correla con quanto visto per l'angiogenesi tumorale, che presenta un profilo diverso dall'angiogenesi fisiologica. I vasi sono infatti irregolari e privi di una struttura con tonache ben definite, senza membrana basale o senza un monolayer continuo di cellule endoteliali. Ciò favorice l'entrata in circolo delle cellule tumorali.

Slide:"figura 24.6"

Mostra la penetrazione di una cellula tumorale in un'arteriola e formazione di un EMBOLO NEOPLASTICO.

La modalità attraverso la quale la cellula tumorale entra in circolo riflette abbastanza la modalità con cui i leucociti migrano fisiologicamente e/o patologicamente.

La differenza fra i due processi sta nel fatto che :

- la cellula tumorale forza la membrana basale ed l'endotelio degradandoli
- dopo la forzatura la singola cellula o il gruppo di cellule possono ricoprirsi di piastrine e formare un EMBOLO NEOPLASTICO

Slide:

Vediamo ora le successive tappe del percorso metastatico

Tappa 5: formazione dell'embolo

L'embolo risulta formato da singole cellule oppure da gruppi di cellule, ricoperte da piastrine o fibrina.

Slide:

Tappa 6: l'embolo entra in circolo

Tappa 7: se tutto va bene l'embolo si arresta nel microcircolo del sito di metastasi, grazie alle molecole di adesione che le cellule endoteliali di quel microcircolo esprimono e con cui l'embolo interagisce efficacemente. Nella maggior parte dei casi nei quali le cellule tumorali riescano ad uscire dal circolo, lo fanno a livello dei capillari o delle venule post capillari.

Questa non è tuttavia l'unica possibilità.

Slide:"figura 8.32"

Infatti la cellula arresta il suo percorso a livello del microcircolo del suo sito di metastasi e qui possono accadere vari eventi:

- Può avvenire un processo di ritenzione all'interno del vaso che è correlato a CAUSE MECCANICHE quali l'impossibilità di attraversare un nuovo filtro capillare a causa delle dimensioni eccessive della cellula neoplastica e delle sue mancate capacità di deformabilità. La cellula può quindi non essere in grado di uscire dal circolo.
- La cellula che si arresta può morire
- se sopravvive può

    Fase 8: dare proliferazione endovasale(se non supera la barriera endoteliale) e distruggere il vaso successivamente quando aumenta di dimensioni

    Fase 9: invadere la parete endoteliale e fuoriuscita fra gli spazi interendoteliali con successiva locomozione e infiltrazione del territorio extravascolare

Slide:"figura 27.35" ce la guardiamo con calma

Mostra gli elementi molecolari che favoriscono l'extravasazione.

Qui entra in gioco la capacità delle celllule tumorali di produrre enzimi che degradino la membrana basale e le cellule endoteliali

NB: può essere che la cellula endoteliale sia <u>attivata</u> per favorire l'adesione e la diapedesi della cellula tumorale, ma ciò non è detto (*il prof stesso non è sicuro della sua affermazione* ndr)

Slide:

Non è detto che il processo poi vada avanti. Ammettendo infatti che la cellula arrivi nel sito di metastasi ed extravasi, essa può avere 3 destini:

- Può morire a causa del microambiente inadatto
- Può permanere nell'organo come singola cellula dormiente che non prolifera
- Può proliferare e formare un aggregato clinicalente silente (MICROMETASTASI). Solo se riesce ad indurre angiogenesi la metastasi diventa <u>clinicamente evidente</u>

QUINDI affichè il processo vada avanti la cellula tumorale deve trovare un microambiente ospitale, fattori di crescita se non riesce a produrne autonomamente e le sostanze nutritizie, che riesce a fornirsi grazie ad una vasolarizzazione adatta. Per ottenere un'adeguata vascolarizzazione può produrre autonomamente fattori angiogenetici o indurre la produzione di fattori proangiogenetici da parte di altre cellule.

Slide:

tappa 10: proliferazione cellulare

tappa 11: produzione di componenti dello stroma

Tappa 12: produzione di fattori angiogenetici

Tappa 13:costituzione di metastasi

Inoltre non dobbiamoi dimenticare che durante tutte le fasi del processo le cellule tumorali devono essere in grado di sfuggire agli attacchi del SI.

Slide:”figure 3”

Ilustra il destino della cellula tumorale nel microambiente metastatico: in seguito alla intravasazione una serie di fattori limitanti condizionano l’abilità di formare il tumore II.

In ciascuno di queste fasi la cellula tumorale può andare in contro a : morte, quiescenza o sopravvivenza. Può essere a sua volta modulata da fattori del microambiente, può essere protetta da aggregati di piastrine e reclutare cellule dal midollo

Slide successiva

Tutte le tappe e le difficoltà del processo metastatico sono correlate all’acquisizione di proprietà fenotipiche elencate in questo schema . solo dopo l’acquisizione di queste caratteristiche la cellula può potenzialmente metastatizzare (*ripete questo concetto più volte e in più lezioni ndr)*

Slide successiva

La cellula può entrare in circolo per via linfatica o ematica.

Come sappiamo la linfa viene poi raccolta dal dotto toracico che si getta nella congiuzione fra vena giugulare e succlavia di sinistra.

Concetto importantissimo è quello delle SEDI DI METASTASI.

Si è notato che determinati organi, quali polmoni e fegato hanno frequenza di metastatizzazione molto alta e maggiore di tutti gli altri. Il coinvolgimento di questi è quindi indipendente dalla sede del tumore I.

Per il fegato ciò è facilmente spiegabile dalle caratteristiche del circolo venoso di quest'organo, che raccoglie sangue dal sistema portale (dall'intestino e dalla milza). Il fegato è definito come SEDE DI FILTRO, non perchè filtri il sangue, bensì perché per forza le cellule presenti ne sangue devono passare di qui ed esso ha caratteristiche che promuovono la metastasi.

Superato il fegato il sangue raggiungerà il polmone, altra sede di filtro e anche qui vi sono caratteristiche che facilitano l'arresto delle cellule e la crescita di tumori secondari

Se poi la cellula supera anche I polmoni entra nella circolazione sistemica e teoricamente può raggiungere ogni tessuto.

Slide: "figura9.33"

Ripropone il percorso di cui il professore ha parlato prima.

Aggiunge che nel momento in cui si fa diagnosi di tumore si esegue di routine una radiografia al torace e un'ecografia per escludere metastasi a polmone e fegato

Slide:

Altro concetto è quello che ogni tumore I ha specifiche SEDI DI METASTASI PREFERENZIALE: ad esempio il tumore del pancreas metastatizza al fegato, il carcinoma alla mammella e il tumore della prostata al midollo osseo, il tumore del colon al fegato.

Slide "figura 3"

Legge la didascalia

Slide "tabella 1"

Legge,ma non capisco, dice che gli esempi sono sbagliati

Slide: figura con esperimento su topo

Esperimento condotto su modello animale topo: si dimostra che un tumore che metastatizza solitamente ai polmoni lo fa anche in un tipo singenico trapiantato.

Cellule tumorali vengono trapiantate nella zampa del topo sano e dopo un certo periodo di tempo si svilupperà una metastasi ai polmoni. A questo punto si amputa la zampa e si inocula tessuto polmonare nella zampa del topo. Si nota che le cellule tumorali metastatizzano anche nel nuovo tessuto polmonare, dimostrando il tropismo per questo tipo di tessuto (*discorso confuso, il profe sembra riferirsi ad un altro esperimento simile. E' consigliabile guardare bene la slide e la relativa didascalia. Riporto i concetti espressi in qualunque caso ndr*)

C'è un tropismo da parte delle cellule tumorali I per un determinato organo

Slide:"figura 9.23"

La metastasi preferenziale, diversa dalla metastasi ad alta frequenza di polmone e fegato, ha spiegazioni conosciute e meno conosciute:

- È dovuta all'espressione di molecole adesive specifiche da parte delle cellule endoteliali del microcircolo di quell'organo
- Per alcuni tumori, è dovuta all'espressione di chemochine nel sito che si legano a recettori presenti sulle cellule tumorali e che ne indirizzino e ne guidino la chemotassi. Ad esempio le cellule del carcinoma mammario esprimono CXCR4 che si lega a CXCL12(SDF1) espressa dal polmone fegato rene e midollo, mentre le cellule del melanoma esprimono CCR10 che lega CCL27 prodotto da siti specifici. Il caso del carcinoma mammario è il primo nel quale si sia dimostrata la correlazione che vige fra chemochine prodotte dal sito di metastasi e recettori espressi dalla cellula tumorale

Slide: "tabella 1" legge velocemente

Slide successiva:

Le chemochine hanno un ruolo importantissimo in molte fasi:

- Nella fase di metastasi preferenziale
- Possono reclutare cellule infiammatorie che possono avere un ruolo positivo o negativo sulla crescita del tumore
- Possono avere azione angiostatica(CXCL9-10-11) o angiogenetica (ERL positive)
- Possono stimolare la produzione di metalloproteasi, facilitando l'infiltrazione tumorale

Slide: "figura4"

La figura mostra che il carcinoma della mammella va a metastatizzare a fegato, polmone e cervello mentre il carcinoma della prostata può metastatizzare al midollo.

Per il medesimo tumore primario esistono meccanismi di metastasi che sono specifici del sito di metastasi stesso detti MECCANISMI DI METASTASI TESSUTO SPECIFICI.

Cellule provenienti dal medesimo tumore primario non metastatizzano tutti allo stesso modo in tutte le sedi di metastasi

(il senso mi sembra questo, ho dovuto rielaborare un po' ndr)

Slide successiva:

Altro importante concetto, scoperto di recente, è quello di NICCHIA TUMORALE: in alcuni tumori I, le cellule sono in grado di produrre fattori che stimolano le cellule dal midollo osseo e le inducono a migrare nel sito di metastasi futura. Questo processo servirà a preparare la nicchia necessaria al tumore per un'efficace metastasi.

Slide "figura 1"

Soprattutto sono cellule mieloidi che migrano nella sede del futuro tumore II e creano la nicchia

Slide successiva

Un altro problema, poco studiato e poco conosciuto, è se esitono categorie di geni specifici per la metastasi: geni soppressori della metastasi che vengono inattivati, anche grazie all'instabilità genetica o geni promotori che devono essere attivati.

Poco si sa dell'esistenza di questi geni, ma in questa figura si nota che mano a mano che prosegue la storia naturale del tumore vi sono geni che sono più facilmente associati alla capacità di dare metastasi mano a mano che la cellula diventa più maligna. (*riporto quanto detto ndr*)

Slide: "tabella 1"

Ce la guardiamo da soli: notare i geni soppressori della metastasi che codificano per proteine che riducono o diminuiscono la capacità di dare metastasi, ma che non sono correlati ad una diminuzione della crescita del tumore I. Questo è in contrasto con il concetto di oncosoppressore, che diminuisce invece lo sviluppo del tumore I. Inoltre, l'inattivazione dei geni soppressori della metastasi avviene durante la fase di progressione del tumore e non nella fase di trasformazione (*riporto quanto detto ndr*)

Slide successiva

Ci sono varie categorie di geni identificati come soppressori della metastasi: citochine solubili, regolatori della trascrizione,regolatori del *incomprensibile* e miRNA

In generale, non riferendosi solo a questi ultimi, nel processo della metastasi è stata osservata l'espressione di miRNA che possono influenzare la migrazione, l'adesione, ETM, infiltrazione della ECM e proliferazione a distanza.

Slide "at a glance"

Riassuntiva, leggere bene.

NEGLI ULTIMI 10 MINUTI DI LEZIONE IL PROFESSORE HA FATTO VEDERE VELOCEMENTE LE SLIDE RIFERITE ALLA RISPOSTA IMMUNITARIA ANTITUMORALE

HA DETTO CHE RITIENE IL RELATIVO CAPITOLO DELL'ABBAS SUFFICIENTE PER QUANTO DOVREMMO SAPERE AL RIGUARDO

RIPORTO QUANTO HA DETTO

Nelle diapositive c'è qualche concetto in più rispetto a quanto presente sull'Abbas.

Ricordare che:

- Esistono antigeni tumorali contro i quali il sistema immunitario reagisce ed impararne la classificazione. Tra gli antigeni si possono identificare marcatori tumorali, che sono espressi e rilasciati in maniera relativamente specifica dai tumori. I principali sono l'alfafetoproteina, la gonadotropina corionica, la fosfatasi acida, l'antigene carcinoembrionario. Alcuni di questi sono prodotti di geni espressi nello sviluppo embrionale che poi vengono spenti. A causa della trasformazione neoplastica tuttavia vengono nuovamente ad essere espressi e possiamo dosarli nel sangue in laboratorio a scopo diagnostico. Non è sempre detto che siano un segno di sicura neoplasia, perchè possono essere espressi anche in altre situazioni patologiche quali l'infiammazione cronica (es CEA). Inoltre essi sono importanti per seguire l'andamento della terapia in un paziente portatore di un tumore. Se il tumore viene rimosso, i livelli del marcatore diminuiscono drammaticamente. Si usa dosare nel tempo il marcatore, in caso di recidiva, se il tumore non è stato esportato efficacemente, o di metastasi infatti esso può aumentare nuovamente.
- Dobbiamo studiare i meccanismi che il sistema immunitario utilizza contro il tumore, le cellule(CD8, NK, , mediatori vari)
- ADCC da macrofagi e NK
- L'importanza delle NK nel riconoscere il missing self. Quando una cellula nk interagisce con una cellula normale, non mette in atto i suoi meccanismi citocidi in quanto riceve segnali attivatori da particolari recettori che riconoscono ligandi sulla cellula normale , ma anche inibitori dal riconoscimento di MHC1 su quella cellula. Le cellule tumorali hanno livelli di MHC1 diminuiti, manca quindi il segnale inibitorio che antagonizzi quello attivatorio all'uccisione e la cellula NK espleta la sua funzione difensiva. Guardare recettori inibitori KIR.
- Esistono strategie di evasione immunitaria da parte del tumore (diminuzione MHC1 e di molecole costimolatorie, di antigeni tumorali, produzione di citochine immunosoppressorie, avvolgimento da parte di piastrine)
- Dobbiamo studiare le modalità di stimolazione della risposta antitumorale(somministrazione di citochine, vaccini)

Lezione di Patologia generale e fisiopatologia clinica (sem2) del 22/5/2013 (1)

Sbobinatore: Maria Silvia Varalta
Revisore: Simone Ferraro
Sbobina 22/5 Minuz

Storia naturale dei tumori
Analizzeremo ora alcuni aspetti della neoplasia dal punto di vista clinico anche se verteremo principalmente sugli aspetti cellulari. Vi sono alcune fasi della formazione neoplastica che abbiamo analizzato la volta scorsa parlando di cancerogenesi fisica e chimica che comunque hanno una valenza generale. Non c'è dubbio che in queste cancerogenesi ci sia una fase iniziale in cui le lesioni molecolari a livello del DNA determinano un danno all'informazione genetica a cui poi deve seguire la promozione. Vi sono delle situazioni che possono favorire in qualche modo la proliferazione cellulare e ciò determina un aumento della probabilità che la lesione iniziale si espanda nella popolazione cellulare interessata dalla massa tumorale. Segue poi la fase della

progressione. Ad un certo punto c'è una progressione spontanea nella cellula così iniziata, vi sono lesioni che favoriscono il mantenimento e l'amplificazione del danno a livello genomico e in qualche modo la cellula diventa genomicamente più instabile e i normali processi di riparazione del DNA vengono ad essere meno efficienti anche se bisogna tener conto della variabilità individuale. Come sapete le cellule di ciascun individuo hanno una capacità specifica di poter gestire sia il danno genomico che la capacità riparativa. C'è così la componente causale del danno ma vi è anche la componente di predisposizione alla capacità di riparazione del danno. Nel corso degli anni si sono accumulate sempre più informazioni riguardo l'associazione tra l'alterazione morfologica e quella molecolare. E' intuitivo pensare che in base al tipo e alla quantità di lesioni biochimiche presenti in una cellula, queste si manifestino come alterazioni morfologiche della cellula. Ogni morfologia è conseguente alla funzione e alla produzione degli specifici prodotti.
Analizziamo il problema partendo dai primi dati emersi con le prime tecniche di analisi del genoma negli anni 80 dove il gruppo di volgestein portò le prime opinioni sul fatto che la progressione tumorale fosse un accumulo di lesioni genetiche. Si studiò sul modello del colon cancer che venne scelto perché è possibile raccogliere facilmente con le colonscopie lesioni a vari stadi di avanzamento. Dal piccolo polipo al carcinoma vero e proprio con degli esami di routine che vengono effettuati spesso nella popolazione, sono attualmente identificati come screening per questa patologia.
In effetti sono ben noti gli aspetti morfologici che vengono analizzati tuttora nella mucosa del colon, dal tessuto sano con le cripte e le cellule mucipare a situazioni a rischio con mucosa iperplasica. Ricordate che in fase di promozione c'è un agente che ha indotto uno stimolo proliferativo, la presenza poi di polipi, non ancora neoplastici ,anche se per alcuni autori già a questo livello ci sono già mutazioni e lesioni molecolari. Tuttavia gli adenomi non hanno un atteggiamento francamente maligno poiché per questo indichiamo la capacità invasiva, capacitò che una normale cellula epiteliale non ha.
Il vero carcinoma si ha quando la crescita è vagamente ghiandolare ma disorganizzata rispetto ad un epiteli normale . Un adenoma comunque non è capace di penetrare la membrana basale e proliferare attraverso tutto lo spessore del viscere come un carcinoma.
A tutte queste fasi sono state associate tutte una serie di lesioni molecolari. Si può partire da lesioni ereditarie, germline, o acquisite anche durante lo sviluppo embrionale, sono situazioni molto rare. Dopo di che si continua con una serie di lesioni abbastanza ben definite, lesioni che ricorrono soprattutto nelle primissime fasi della trasformazione neoplastica e altre che invece si associano a lesioni sicuramente più gravi. La quantità di lesioni aumenta progressivamente. Tra questi geni lesi ve ne sono alcuni deputati all'integrità del genoma. Quando questi vengono alterati il numero delle lesioni genetiche aumenta in modo esponenziale e con queste la capacità di sperimentare nuove funzioni cellulari da parte della neoplasia formata da una popolazione cellulare sempre più eterogenea. In un lavoro di qualche anno fa vennero identificati più di 50 cloni diversi di una neoplasia. Per quella serie di mutazioni genetiche analizzate nel pannello i ricercatori furono in grado di rilevare 50 combinazioni ed è probabile ce ne fossero molte altre. Si viene così a formare un'"ottima squadra" per la neoplasia per poter fare qualsiasi cosa. Molto spesso quando si tratta una neoplasia con dei farmaci riusciamo ad ottenere anche remissioni complete della malattia, cioè questa clinicamente scompare, per poi ricomparire più tardi con manifestazioni di malattie resistenti al trattamento stesso. Nel giro di pochi mesi o anni si sono rapidamente evoluti cloni più maligni. Possiamo aver eliminato il 99% delle cellule ma qualcuna delle varianti che è sopravvissuta ha proliferato a seguito della pressione selettiva indotta dall'eliminazione delle altre. Quella variabile resistenze che in origine era una piccola percentuale della massa totale è diventata la massa principale della neoplasia che può riemergere.
La remissione spontanea è rarissima, ci sono delle forme di regressioni non proprio molecolari ma meglio "varianti sul tema". Si sono osservate alcune regressioni spontanee di alcuni tumori ma legate più a fattori ignoti o comunque a meccanismi immunologici. Sicuramente si può indurre differenziazione attraverso alcuni meccanismi farmacologici specifici ad esempio nella leucemia

mieloide acuta, la variante promielocitica, che è sensibile all’acido retinoico poiché ha una proteina di fusione chiamato PML RAR che risponde a questo analogo dell’acido retinoico. Il PML RAR in patologia è mantenuto nel citosol, con il trattamento viene fatto traslocare nel nucleo e lì va ad agire come il fattore di trascrizione normale. In questo modo si riesce a trattare con quel farmaco solo quello specifico tipo di neoplasia. Per questo è importante la diagnosi precisa perché i farmaci sono tanto efficaci quanto selettivi, altrimenti l’azione è nulla.
Sicuramente, come venne descritto già negli anni 70, mescolando cellule normali con cellule tumorali c’è una soppressione della crescita delle cellule tumorali a dimostrazione dell’esistenza dei tumor suppressor gene. Trasformare questo esperimento in qualcosa di più complesso che sia proof of principles è ancora molto complesso, non è ovviamente possibile pensare di curare un tumore fondendolo con cellule normali, almeno per ora.
La strategia più plausibile per la cura del tumore è l’eliminazione della cellula tumorale, gli ultimi sforzi della ricerca sono mirati ad individuare quelle lesioni geniche che permettono di colpire in modo selettivo una cellula tumorale ed eliminarla proprio perchè le lesioni ,anche da parte del cariotipo della cellula tumorale, sono talmente gravi che sono irrecuperabili.
Nella storia naturale del tumore troviamo delle fasi che si possono definire preneolpastiche, anche se però la presenza di lesioni geniche a questo livello solleva discussioni sulla liceità della denominazione. Tuttavia si ritengono maligne quelle cellule che hanno la capacità di attraversare la membrana basale, tutte le altre sono già neoplastiche ma clinicamente meno pericolose, da qui la dicitura di preneoplastiche. Possono tuttavia evolvere in situazioni più gravi, per questo è fondamentale l’individuazione precoce. La displasia è quella fase del carcinoma in cui le cellule hanno le caratteristiche morfologiche del carcinoma ma non ancora quelle funzionali, la più importante delle quali è la penetrazione della membrana basale. Questa displasia è una proliferazione disordinata ma non ancora neoplastica clinicamente. Bisogna sottolineare questo argomento di denominazione perché la ragione sta da entrambe le parti ma non spetta a noi approfondire questa discussione.
Abbiamo cellule con cambiamento morfologico associato ad un’alterazione biochimica, queste cellule quindi sono alterate genomicamente, la modifica può essere epigentica e cioè riguardante i meccanismi di controllo del genoma, soprattutto a livello degli epiteli. I cambiamenti displastici si trovano a tutti i livelli ma si conoscono di più quelli in zone facilmente studiabili e accessibili, dove per analizzare è sufficiente lo striscio.
Quando i cambiamenti displastici interessano tutto lo spessore dell’epitelio ma non lo superano e si parla di carcinoma in situ. Questo è un passaggio clinicamente molto importante perché è una sorta di discrimine tra una lesione che può essere rimossa con garanzia di guarigione per il paziente del 100% e una situazione analoga con evidenze anche di microinvasività. La definizione di questo aspetto è fondamentale e dà una prognosi molto diversa per il paziente. Non si dice a volte al paziente ma gli si consiglia di venire a controlli molto più ravvicinati se è presente microinvasività della massa.
Il carcinoma in situ è un precursore, quasi sempre, poiché non si può avere la certezza assoluta, di un carcinoma invasivo. Lasciare un carcinoma in situ è un rischio molto grosso perché la successiva fase è l’invasione; sappiamo già che c’è un alterazione genetica anche se non la conosciamo nel dettaglio; magari un giorno si riuscirà, attraverso analisi genetiche, a conoscere esattamente la lesione presente nello specifico paziente. Di certo dal punto di vista molto pratico si fa prima a togliere la massa.
Questi aspetti di displasia devono essere valutati perché non sono sempre dovuti a lesioni genomiche , talora sono delle forme reattive. Posso avere un’infiammazione cronica che mi alzi il numero di citochine che vanno a modificare il programma genico in modo reversibile. Una volta che io le rimuovo le mie cellule tornano ad uno stato pre modifica. E’ come lo stato di ipertrofia indotto da attività fisica, divento un culturista e poi se smetto di allenarmi torno ad avere una muscolatura normale . C’è una capacità da parte delle cellule di cambiare il proprio aspetto in base allo stimolo esterno, il problema è l’eventuale persistenza della modificazione una volta che manchi

lo stimolo infiammatorio.In quel caso si è fissato nel genoma ed è presente una qualche mutazione ben più problematica rispetto ad una modifica epigenetica.
Questo tipo di alterazioni sono più studiate a livello di cervice uterina e prostata, organi che mostrano uno stato epiteliale molto ben organizzato, con uno strato basale ed uno superficiale dove sono presenti cellule epiteliali staminali. Come in tutti gli epiteli e poi è presente lo strato differenziativo verso la superficie più squamosa che appare corneificata a livello della cute, ma assolutamente no a livello della prostata.
Come vedete queste alterazioni sono morfologicamente evidenti e permettono all'istologo di classificarle, si è creata infatti una scuola che ,attraverso Consensus Conference, e cioè conferenze in cui studiosi si riuniscono e mostrano le lesioni dei loro campioni, ha sviluppato una nomenclatura. Ad esempio si definisce displasia lieve se è presente una lesione che non arriva alla superficie e comprende solo 1/3 dello strato cellulare, da lì si passa alla moderata, alla displasia grave o per qualcuno già carcinoma in situ. E' importante conoscere queste nomenclature perché pazienti provenienti da centri diversi potrebbero avere una o l'altra per indicare lo stesso tipo di lesione.
Il carcinoma microinvasivo c'è quando viene sfondata la membrana basale e cellule neoplastiche si trovano sotto ad essa. Vale anche per la prostata dove la struttura è diversa ma si parla allo stesso modo di displasia lieve e carcimona microinvasivo.
Nel carcinoma della cervice uterina si intravede la membrana basale, ma dovremmo vedere dei "gettoni cellulari" che entrano all'interno e perdono questa continuità che invece è presente nel carcinoma. Queste cellule neoplastiche man mano che salgono arrivano alla superficie, infatti grattando la superficie posso recuperare nelle displasie lievi e moderate cellule di un certo tipo. Quando arrivo al carcinoma microinvasivo o displasia grave vedrò cellule diverse e quindi il PAP test va a rilevare questo.
Se il tessuto è sano troverò cellule con aspetto simile a quelle della mucosa orale. Vi sono poi siti con displasie di medio grado e poi francamente neoplastiche. Un indizio è anche il rapporto nucleo citoplasma. Da questi dati ho un segnale d'allarme, viene richiesto allora un ulteriore livello di analisi perché questo striscio non ci dà la profondità della lesione, ho bisogno di una biopsia. Quest'analisi è un prelievo di tessuto che attraversa l'intera superficie per vedere la membrana basale.
Queste lesioni precancerose e il carcinoma in situ precedono nel tempo la neoplasia invasiva. C'è un'associazione statistica molto rilevante tra presenza di queste e rischio di comparsa dell'altra. Senza trattamento l'incidenza di neoplasia invasiva è altissima; possiamo avere anche coesistenza, si può individuare una neoplasia in situ e avere poco più in là una invasiva. Si cerca con i prelievi di ottenere un'analisi dell'area da cui preleviamo il campione. Possiamo avere una componente ereditaria, soprattutto per le neoplasie cutanee dove abbiamo quegli aspetti morfologici identificabili. Se effettuo un prelievo di sangue non riesco a vedere questi aspetti istologici che potrebbero essere presenti. Se analizzassi il midollo potrei avere degli indizi ma, per la sua natura, il midollo non può essere analizzato con metodi riproducibili mentre un prelievo di tessuto è molto più standardizzabile nonostante l'esistenza di punti di criticità. Varie scuole stanno infatti cercando dei marcatori che siano discrimen per la classificazione non solo morfologiche, già fornite da ematossilina eosina, ma anche molecolari. Alcune alterazioni che rappresentano indicatore di rischio sono la neoplasia duttale della mammella, nevi, fibropatia policistica, cose che comunque ritroverete nel corso degli studi.
(Ndr: facendo riferimento alla slide con un'immagine di nevo) Vedete 3 immagini, una di un nevo con cute con melanociti, un nevo giunzionale con accumulo di melanociti nelle giunzione dermo-epidermica e infine un carcinoma dove i melanociti invadono tutto, spesso la cute. Nella fibropatia policistica della mammela, diversamente dal tessuto sano dove vediamo i dotti separati da tessuto fibroso e adiposo, troviamo grandi dotti dilatati con microcalcificazione che sono un sintomo anche delle alterazioni maligne. Quindi questa mastopatia benigna crea problemi di diagnosi differenziale poiché trovare microcalcificazioni in un contesto di alterazione morfologica mi crea difficoltà e

dubbi diagnostici, devo allora chiedere ulteriori esami e un follow-up molto più accurato con anche costi associati non moderati.
Cosa succede dal punto di vista molecolare? Il problema è sempre riferibile alla cellula che ha subito queste alterazioni e le cellule neoplastiche riescono ad acquisire una capacità di proliferazione alterata a seguito di modificazioni varie e livello della loro struttura e del genoma. Tuttavia ci sono regole comuni per queste alterazioni che vanno a colpire almeno 5 o6 grosse vie di segnalazione associate a specifiche funzioni. Per avere una cellula francamente neoplastica ed invasiva maligna bisogna avere alterazioni della
1.Proliferazione cellulare, in qualche modo questa cellula deve proliferare o non morire, effetto finale di accumulo, tumor.
2.I segnali di sopravvivenza devono essere autonomi, senza stimoli
3.Vanno inibiti i meccanismi di senescenza
4.È necessario chele cellule stimolino da sole l'angiogenesi, altrimenti la massa cellulare potrebbe crescere solo di qualche millimetro, un'ulteriore crescita senza vasi porterebbe necrosi alla massa cellulare. Talvolta infatti le masse tumorali hanno al centro una zona necrotica. Non sarebbe un problema avere lesioni di pochi mm, si cronicizzerebbe la malattia e quindi diciamo che clinicamente sarebbe meno grave. Tuttavia l'angiogenesi c'è e dà una possibilità di nutrimento limitata solo dalla eventuale morte del paziente.
5.Capacità di invasione e metastasi, si muore di metastasi. C'è inoltre la capacità invasiva locale che può essere molto pericolosa se ad esempio mi invade l'aorta portando dissecamento e morte per emorragia.
6.Devono essere alterati i geni riparatori del DNA altrimenti la neoplasia rimane solo una possibilità di accumulo delle lesioni. Un individuo può portarsi dalla nascita una cellula con 5 di queste caratteristiche ma non avere mail la sesta e quindi muore a 95 anni non per cancro o al massimo con una lesione preneoplastica localizzata. Il 95% degli uomini che muoiono a 90 anni hanno cancro alla prostata o una qualche forma neoplastica, ma subcliniche, senza sintomi.

CONTROLLO DELLA PROLIFERAZIONE
Ci sono fattori di crescita endogeni o ad attivazione costitutiva delle vie di trasduzione per iperespressione o mutazione genica. I segnali di sopravvivenza sono moltissimi, vi dò solo dei flash per capire. Vediamo l'attivazione di oncogeni, meccanismo principe della crescita neoplastica, che facilitano la sopravvivenza di queste cellule. distinguiamo segnali di sopravvivenza e inibitori dell'apoptosi. Per quanto riguarda la senescenza se voi prendete dei vostri fibroblasti e li mettete in vitro, dopo 60/ 70 divisione la cellula si ferma. Per quelle neoplastiche è invece differente, tuttora sono studiate nei laboratori di tutto il mondo le HELA cells, dalle iniziali di Henrietta Lacks, paziente che negli anni 50 morì di tumore alla cervice uterina. Ad oggi le sue cellule tumorali sono ancora vive e sono usate come modello di neoplasia.

Angiogenesi, importantissima, è la crescita di nuovi vasi o di vasi preesistenti attraverso la gemmazione e crescita delle cellule endoteliali, non è vasculogenesi prenatale che invece crea vasi a partire dai precursori, gli angioblasti.
La fase più importante associata al tumore è l'innesco dell'angiogenesi. La lesione può rimanere displasia, carcinoma in situ fino a quando non arrivi l'attivazione dell'angiogenesi, solitamente la diagnosi arriva a questo stadio dove troviamo una crescita esponenziale della neoplasia, una fase molto avanzata. All'angiogenesi si associa la capacità di metastatizzare, è il periodo più pericoloso. L'angiogenesi tumorale è dovuta a diversissimi fattori che influiscono sbilanciando il rapporto tra fattori pro e anti angiogenetici, andando a favore dei pro come ad esempio mutazioni genetiche come quelle della p53, un oncosoppressore molto critico. La cellula tumorale promuove dunque lo sviluppo dei vasi non perfettamente funzionanti come i vasi normali ma comunque efficienti nel portare nutrimento alla massa tumorale.

NDR: L’elenco e le caratteristiche dei fattori pro angiogenetici che troviamo alterati nelle neoplasie vanno letti e dovremmo saperli per il futuro, l’unico che il professore legge è VGF che rappresenta un target terapeutico per la cura di tumori.
Ci sono poi degli inibitori dell’angiogenesi presenti naturalmente, le angiostatine , l’endostatina, alcune citochine, l’interferone, delle chemochine, alcuni inibitori degli enzimi eccetera.
La situazione è molto complicata perché ci sono recettori di vario tipo, gli stessi ligandi dei fattori angiogenetici sono promiscui e possono legare più recettori .La combinazione è dunque molto complicata e prevedere quello che succede quando somministro un fattore angiogenetico è difficile, dipende anche dal contesto, dal tipo di recettore presente, non solo dal farmaco che somministro.
Parlando del fenotipo mutatore, parliamo di alterazioni del genoma, per darvi un’idea le alterazioni spontanee del genoma normalemente nella replicazione del dna sono un nucleotide ogni milione, e avendo circa 3 miliardi di nucleotidi potete facilmente calcolare quanti siano; tutti questi errori vengono riparati dal nostro sistema di controllo . Quando abbiamo alterazione di solo uno dei meccanismi che controllano la riparazione si passa ad una media di errori di 1 ogni 100/ 1000 paia di basi ,arrivando ad avere 10000 volte più errori. Il lavoro del sistema di riparazione diventa enorme e per quanto possa essere efficiente non lo è abbastanza in queste condizioni.
Queste alterazioni avvengono nelle sequenze dette microsatelliti, regioni altamente ripetittive.
Un altro fattore promuovente la neoplasia è l’instabilità cromosomica, alterazioni nelle fase di replicazione della cellula che spostano interi blocchi di genoma. Quando ho una traslocazione cromosomica o una una lesione cromosomica ho centinaia di geni che vengono spostati o deleti o duplicati.
La fase finale dell’invasione neoplastica è la metastasi, la fase clinicamente più pericolosa.Vi sono moltissime molecole coinvolte, fattori di adesione, integrine, metalloproteasi che degradano la matrice e la cui produzione è fondamentale per poter invadere il tessuto.
La metastasi porta ad un focolaio neoplastico secondario provenendo da uno primario. Conseguenza della metastasi può essere la comparsa di nuovi cloni tumorali con fenotipo che va a potenziare la motilità a discapito dell’adesività e dell’aggregabilità. Per queste cellule metastatiche il fenotipo è molto selettivo rispetto alle non metastatiche, molti studi cercano di individuare questi aspetti per renderli target farmacologici.
Le fasi metastatiche sono il distacco, la disseminazione, la migrazione, l’arresto a distanza e l’impianto vero e proprio. Delle cellule tumorali poche riescono a passare, alcune vanno nel vaso, il 99% muoiono in circolo, quelle che riescono a localizzarsi a distanza e ad aderire formano una colonia a distanza e comincia allora l’angiogenesi con la formazione dei piccoli vasi che comporta aumento di massa.
C’è una certa preferenzialità metastatica e delle vie anatomiche che favoriscono certi distretti, come il colon che comunemente dà metastasi al fegato a causa della convergenza dei vasi. La metastasi epatica viene inizialmente trattata con epatectomia parziale, dopo di che se arriva al cuore e ai polmoni da lì la cellula può in pochi minuti raggiungere qualsiasi distretto con effetti devastanti.
Il motivo della localizzazione metastatica può non essere del tutto anatomico, c’è una preferenzialità biochimica, infatti da esperimenti su topolini si è visto che impiantando un tumore questo va al polmone e poi togliendo la zampetta in cui era stato impiantato, e reimpiantando il tessuto polmonare fuori dal polmone, quindi dalla preferenziale sede anatomica, vediamo come la metastasi vada a finire proprio in questo tessuto. Quindi indipendentemente dalla struttura anatomica e dalla funzione di organo filtro del polmone c’è una preferenzialità biochimica e molecolare che favorisce ciò.
Questo importante lavoro del 2000 mostra l’importanza dei recettori delle chemochine per le metastasi. La figura tratta dallo studio mostra come ci siano dei recettori per chemochine che favoriscono l’impianto. Le metastasi possono formarsi per via ematica, o linfatica. In base alla via che intraprendono raggiungono un organo bersaglio per motivi meccanici o perchè trovano un ambiente più favorevole, si fermano nell’organo e possono rimanere dormienti anche per anni. Non sempre una cellula che arriva nel sito deve proliferare, può rimanere silente per anni, non è ancora

chiaro il meccanismo molecolare ma si cerca di scoprirlo per scopi terapeutici. Le metastasi possono anche morire ma purtroppo basta anche una sola cellula per ricreare una neoplasia. Rimane il capitolo problematico delle cellule staminali tumorali. Ne sono state evidenziate una quota anche in circolo, che sono da sole o con pochissime cellule, in grado di reimpiantare un tumore. Nei topolini si è visto come basti una sola cellula per ricreare un tumore nel giro di qualche mese, la capacità di origine clonale della neoplasia è molto importante.
Domanda di una studentessa: "Una displasia è un tumore benigno? un'alterazione come un polipo ha caratteristiche benigne?" " Non è proprio così, un' alterazione come un polipo ha caratteristiche citologiche e biochimiche sovrapponibili ad una cellula normale. La cellula di un polipo per l'alterato rapporto nucleo citoplasma è già da considerare un carcinoma in situ o comunque un'alterazione neoplastica. Il passaggio tra neoplasia benigna come un polipo che mantiene una morfologia molto legata a quella normale e una fase displastica è come una scala di grigio. E' come chiedere di dare un nome a gradazioni di grigio in base alla maggior vicinanza al nero o al bianco. Sono semplicemente classificazioni che danno i medici come quadro. Mentre è chiara la distinzione tra polipo benigno e carcinoma in situ, nel mezzo ci sono molti stadi difficili da classificare. Per risponderle dunque, ogni alterazione va vista inquadrando il paziente nell'insieme. Con le nostre analisi noi andiamo a fare un flash sulla storia naturale del tumore, in qualsiasi stadio esso si trovi

Una studentessa domanda "perché lei ha detto che la displasia lieve comprende solo 1/3 degli stradi?" il professore risponde che è solo un dato indicativo, l'adesione inizia nella fase più profonda e se quindi faccio uno striscio non va bene perché lo strato superficiale non mi mostra queste lesioni. Tant'è che prevendo questo si richiedono controlli annuali in modo da controllare le lesioni che in ogni caso non riescono nel giro di una anno a diventare qualcosa di invasivo.

"Nella leucoplachia invece dove c'è un eccessivo strato corneo è perché le cellule si differenziano troppo?" "evidentemente c'è un ambiente favorevole all'alterazione della replicazione cellulare. La domanda a cui il clinico deve rispondere è a che cosa sia dovuta questa alterazione, un'infezione virale, è una mutazione genica specifica o uno stato cronico?

PROFESSOR MINUZ
INSUFFICIENZA EPATICA
Abbiamo visto gli aspetti metabolici e le più comuni cause delle insufficienze epatiche che si accompagnano al meccanismo di adattamento fisiopatologico emodinamico che determina la formazione di ascite ed edemi. Un meccanismo di guadagno idrosalino senza limite dovuto al fatto che abbiamo un'alterazione delle pressioni idrostatiche a livello del circolo capillare portale, splenico ed intestinale va così a formare circoli capillari collaterali.
Aumenta il rischio emorragico per l'alta pressione idrostatica nelle vene esofagee e per l'alterata capacità del fegato di sintetizzare i fattori della coaugulazione, siano essi vitamina k dipendenti che indipendenti, giungendo dunque ad emorragia da discoaugulopatia acquisita.
Quest'ultima è complicata ulteriormente da piastrinopenia dovuta iperaldosteronismo a flogosi cronica che determina una bassa produzione midollare di piastrine da megacariociti e un aumentato turnover da aumentato consumo e sequestro splenico .
Altre alterazioni che contribuiscono sia all'ascite che allo stato disfunzionale in insufficienza epatica sono ipovolemia che determina sia iponchia sia anche alterazioni di trasporto di sostanze a livello del circolo sistemico.

Tra questi fattori è presente anche l'accumulo di bilirubina, prodotto di degradazione dell'eme nel quadro della fisiologica distruzione dell'emoglobina. Alla produzione della bilirubina segue la quella della bilirubina non coniugata che viene veicolata proprio dai tessuti periferici dove avviene

l'emocateresi fino al fegato dove viene coniugato oppure in circolo dove ci sia emolisi intravascolare . Se io analizzo la quantità totale e la componente relativa delle bilirubina coniugata rispetto a quella non coniugata ho un'idea di quali alterazioni della funzionalità epatica mi trovo ad affrontare. Un valore aumentato della bilirubina indiretta può essere una spia non solo del metabolismo dell'emoglobina, che può mostrare ad esempio emolisi neonatale oppure emolisi conseguente a patologie acquisite, può essere un difetto genetico a livello epatico o spesso una incapacità dell'epatocita di operare la coniugazione. L'aumento della bilirubina indiretta nell'epatopatia cronica e nell'insufficienza è espressione di un danno cellulare.
Un accrescimento della bilirubina DIRETTA(?) può anche essere dovuto ad un meccanismo flogistico con rimodellamento strutturale delle strutture epatiche come nella cirrosi avendo dunque un difetto di escrezione biliare. La cirrosi coinvolge i setti, gli spazi portali, determina una chiusura e un mancato drenaggio verso i canalicoli biliari della bilirubina. Questo determina un riversarsi della bilirubina diretta direttamente in circolo dove aumenta visibilmente. Il risultato è che spesso si ha una condizione per cui la bilirubina aumenta complessivamente sia nella sua quota diretta che indiretta , è di regola l'espressione di un quadro di insufficienza epatica.
Se si ha un ostacolo all'escrezione di bilirubina a valle del fegato nel tratto extra epatico dei dotti biliari a livello del coledoco dovuto a neoplasia o cancro avete un aumento di bili diretta.
Un aumento solo della bilirubina INDIRETTA fa pensare ad una patologia non epatica, invece per un accumulo della diretta pensiamo ad una patologia ostruttiva che può non essere intraepatico, coinvolgendo primariamente i dotti biliari interepatici.
Se c'è un ostacolo all'escrezione biliare aumenta la bilirubina ma si altera anche il ciclo degli acidi biliari. La bilirubina dà il colore alla bile ma la funzione digestiva è dovuta agli acidi biliare, acidi primari prodotti dal fegato attraverso il metabolismo del colesterolo. Servono a mantenere in equilibrio il livello ematico di colesterolo determinando un'utilizzazione di quello assunto con la dieta e di quello derivante dal turnover delle strutture cellulari.
Gli acidi biliari attraverso il coledoco giungono all'intestino dove c'è un riciclo con la formazione di acidi biliari secondari attraverso il metabolismo operato dalla flora batterica intestinale. Per questo il pool degli acidi biliari è dato dagli acidi primari e secondari che derivano dal riciclo enteroepatico degli acidi biliari.
Se noi abbiamo una condizione per la quale gli acidi biliari sono prodotti in minor quantità oppure questi non giungono all'intestino perché ostacolati ad esempio da una neoplasia del coledoco oppure un calcolo. Non avviene dunque la solubilizzazione degli acidi grassi, i trigliceridi sono scissi dalle lipasi in digliceridi e monogliceridi ma la solubilizzazione e il trasferimento all'enterocita avvengono perché ci sono gli acidi biliari. Posso avere una condizione di malassorbimento dei lipidi in una condizione di insufficienza epatica ancor più se questo si accompagna ad una condizione di ridotta capacità escretiva. Si determina dunque steatorrea. Posso analizzare e comprendere il ruolo relativo della carenza di acidi biliari rispetto alla carenza di lipolisi. Se ho steatorrea da trigliceridi la carenza sarà lipasica dovuta ad esempio ad un deficit di funzionalità pancreatico, se questa neoplasia si estende oltre il dotto biliare principale e quindi al dotto di Wirsung la lipasi non riuscirà ad arrivare. Avendo un'atrofia del pancreas questa non riuscirà a scindere i trigliceridi.
Una steatorrea con acidi grassi già digeriti sarà data da un difetto di presenza nel lume intestinale di acidi biliari oppure da un difetto di assorbimento intestinale.
La steatorrea è una condizione comune che può essere classificata fisiopatologicamente in base all'escrezione che la compone.
Se ho un difetto di escrezione di acidi biliari non solo gli acidi grassi saranno inibiti nel loro assorbimento ma anche tutte le sostanze liposolubili come le vitamine A, D e K. Per cui avendo un difetto misto, come avviene nell'insufficienza epatica di coniugazione ed escrezione io ho bassa produzione anche di acidi biliari oltre che di bilirubina. Una condizione in cui il difetto coagulativo dato dalla ridotta sintesi epatica dei fattori della coagulazione si complica

ulteriormente perché manca il processo della carbossilazione dei fattori della coagulazione vitamina K dipendenti (VII, IX e X) che determina un difetto della sintesi specifica di questi fattori.
Un test specifico è il tempo di protrombina che studia in modo selettivo la funzionalità del fattore VII della coagulazione. Se ho un'insufficienza epatica con un difetto di escrezione e assorbimento di vitamina K, ho un'alterazione molto marcata del tempo di protrombina rispetto al tempo di tromboplastina (???) parziale attivato che è più sensibile alla via intrinseca e al fattore VIII ricordate è l'unico fattore non prodotto dl fegato.
L'insufficienza epatica quindi con difetto coagulativo è ulteriormente complicato perché oltre a ridotta sintesi ho anche una ridotta carbossilazione da deficienza di vitamina K.
L'insufficienza epatica si presenta con varia sintomatologia, neuropatia da ammoniemia, ipoalbuminemia, difetti coagulativi che portano emorragia e infine difetti che possono portare a disfunzione renale per mancanza di controllo vasomotorio e distrettuale per cu c'è vasoldilatazione del circolo cutaneo e allo steso tempo fenomeni di vasocostrizione intrarenali.
Brevemente analizziamo aspetti di mal digestione che possono essere autonomi dall'insufficienza epatica, come la mal digestione glucidica da deficit di disaccaridasi (lattasi). Il risultato è una diarrea osmotica che è dipendente, anche temporalmente, dall'assunzione di cibo poiché devono esserci zuccheri non assorbibili nel lume intestinale. Nel caso di difetto di lattasi gli eventi sono successivi l'assunzione di latte. Quello che distingue la diarrea da malassorbimento dalle altre è la dipendenza dall'assunzione di zuccheri non assorbibili. Quando avete una diarrea che persiste al di là dell'assunzione del cibo molto probabilmente il difetto è di assorbimento intestinale, oppure è presente un fenomeno di secrezione attiva come in alcune infezioni batteriche intestinali.

SHOCK

La condizione di shock è terminale a molte situazioni di patologie ed è una complicanza gravissima. Dal punto di vista fisiopatologico si intende una condizione di deficit di perfusione e quindi nutrizionale e di ossigenazione degli organi, multi organo che compare quasi sempre come conseguenza di una grave perturbazione circolatoria.
Le componenti del circolo sono:
Funzione cardiaca, i volumi, il tono vasomotorio e la permeabilità delle pareti vascolari, soprattutto a livello capillare dove impediscono l'uscita di proteine.
Se uno qualsiasi di questi fattori è alterato di entità grave e persistente può dare shock.
Una perdita di volume massivo da emorragia, un infarto, una puntura d'insetto che provochi una vasodilatazione e shock anafilattico per liberazione di elementi vasoattivi; possono determinare una condizione di shock.
Di solito c'è l'idea che lo shock sia un evento acuto che si sviluppi rapidamente, la cosa è in parte vera perché ci sono poi situazioni come lo shock settico che si possono sviluppare in tempi molto molto lunghi e che può essere in parte compensato.
Per alcuni aspetti in adattamento funzionali del circolo ci sono sempre come la cattiva perfusione dei tessuti. Questo può essere letto in modo semplice perché, anche se ci fosse la capacità di scambio a livello polmonare manca la capacità di scambio dei nutrienti e ossigenazione dei tessuti. C'è una ridotta capacità di cedere ossigeno e nutrienti ai tessuti e questo determina una disfunzione multi organo che se è grave e persistente porta morta. Lo shock ha in sé una certa incompatibilità con la vita. In termini generali si possono rilevare alcuni aspetti del tipo emodinamico che sono caratteristiche di alcune forme di shock ma non sono così omologabili.
Sicuramente la ridotta pressione di perfusione è uno di quegli elementi caratteristici e anche l'aumento del pool venoso e l'incapacità dell'adattamento funzione del circolo distrettuale. Questi sono aspetti variamente rappresentati ma spesso comuni.
La forma più classica si shock è quello settico in cui tutto questo si riassume completamente, nelle altre la componente emodinamica può essere variamente alterato. Quello che si determina a livello periferico è un'ipossia tissutale, un accumulo di scorie metaboliche che possono dare alterazioni del

micro circolo, aumento di CO_2 a livello dei tessuti , un aumento della permeabilità, e poi tipico dello shock settico è l'induzione di un'alterata funzione endoteliale per cui si attivano dei processi di trasferimento e passaggio transcapillare di leucociti e piastrine che portano all'attivazione di una superficie pro trombotica favorita anche dall'attivazione piastrinica leucocitaria per cui si innescano dei processi di Coagulazione Intravascolare Disseminata che rispetto alla coagulazione fisiologica è un processo non dato da una lesione endoteliale ma disseminato, dato da eventi sistemici tra cui una generalizzata attivazione delle cascate della coagulazione attraverso un'alterata espressione delle cellule che riguardano il lume vascolare di fattore tissutale.
I meccanismi che possono portare allo shock sono meccanismi cardiaci, basso riempimento, arresto del ritorno venoso ad esempio nell'embolia polmonare, ridotta contrattilità da infarto del miocardio, alterazione delle resistenze periferiche anche con una caduta delle pressioni per eccesso di vasodilatazione a valle quindi tutte condizioni che possono alterare la gittata sistolica possono generare shock. Lo shock può anche essere cardiogeno ,da ridotta contrattilità, cioè la conseguenza più avanzata di uno stato di insufficienza cardiaca . I meccanismi vascolari implicati sono ad esempio un alterato controllo vasomotorio, ad esempio un trauma spinale alto determina una mancanza di controllo vasomotorio, se sta in posizione eretta ci sarà una caduta di pressione ma, se manca il controllo vasomotorio e questa condizione persiste, ci sarà shock.
Lo shock neurogeno viene da attivazione di meccanismi vasodilatatori come una puntura d'insetto che determina vasodilatazione massiva da rilascio di istamina e fattori che alterano anche la permeabilità vascolare. Ci sono dei mediatori secondari come l'induzione della produzione di ossido nitrico attraverso la via della NO sintasi inducibile. Anche nell'uomo e in alcuni distretti vascolari ;alterato rilascio di fattori che vasocostringono un organo per cui abbiamo ipoperfusione renale dovuta ad endotelina e trombossano e a eccesso di angiotensina II. Alla fine ttengo un'alterazione del microcicolo.
Tanti fattori che regolano in modo contrapposto la diffusione tissutale possono essere alterati nel loro equilibrio per cui alla fine si rilasciano fattori in eccesso per cui abbiamo una disregolazione del circolo tissutale attraverso un'alterazione di circoli tissutali. La formazione nel microcircolo di aggregati agglutinati a piastrine e linfociti sono aspetti della flogosi a sua volta tipico di molte forme di shock. Se avete una risposta sistemica innata che determina poi una risposta emodinamica e di alterata permeabilità giungete allo shock settico. Alterato microcircolo e attivazione endoteliale può portare occlusione dei piccoli vasi e a livello sistemico fenomeni di CID. Nel microcircolo uno degli aspetti più tipici dello shock è bypassare il circolo nutritizio.
Uno degli aspetti più caratteristici dello shock è il fatto che se andiamo a misurare la po2 nel sangue arterioso e in quello venoso, vediamo che il differenziale di po2 è molto basso. In condizione di shock l'ossigenazione sia a livello alveolare che arteriolare può essere regolare ma comincia ad alterarsi quando compare un danno multi organo.
Caratteristico dello shock, anche nelle fasi compensate è che il sangue arterioso rimane tale anche dopo il passaggio nel circolo capillare, c'è una bassa estrazione di ossigeno, una bassa capacità di diffusione ai tessuti e di conseguenza una bassa escrezione da parte delle cellule. Il risultante appare semplice, è lo shock. Anche nelle fasi iniziali una delle analisi più facili è il differenziale artero-venoso di ossigeno. Se voi vedete un'alterazione a basic analisi come si diceva una volta in termini clinici , un'alterazione dei meccanismi di autoregolazione del circolo capillare, la conseguenza sarà che il sangue tenderà ad avere un flusso , come avete visto nell'insufficienza epatica che dà uno stato di shock subclinico, determina un passaggio diretto del sangue dal circolo arterioso a venoso senza estrazione. L'edema tissutale appare in conseguenza di tutto ciò, è inevitabile e legato al fatto che l'endotelio è permeabile alle proteine quindi determina la pressione oncotica che di solito è zero nell'interstizio. I mediatori sono moltissimi in questa disfunzione endoteliale. Si innesca un processo flogistico con alterazione endoteliale e attivazione della piastrina, formazione di microtrombi nel circolo capillare con attivazione piastrinica e anche leucocitaria poiché viene associato il processo flogistico. Il risultato è un'attivazione della cascata coagulativa poiché le micro particelle e l'endotelio espongono sulla loro superficie il fattore tissutale. La Cid che

caratterizza soprattutto lo shock settico è conseguenza dell'alterazione endoteliale conseguente alla flogosi e all'espressione del fattore tissutale da parte dei monociti che possono essere attivati attraverso una via di segnale toll like receptor.
Si ha sempre un'attivazione del sistema simpatico a meno che non ci siano lesioni.
Riassunto: alterazione microcircolo, ipossia stagnante, attivazione coagulazione, edema tissutale. Il risultato finale è una grave insufficienza multi organo. Clinicamente il quadro è reversibile.
Condizioni che possono determinare shock, le classificazioni sono fatte in base al meccanismo fisiopatologico. Vediamo shock ostruttivo, ipovolemico, maldistributivo, shock settico.
Semplificando è importante ricordare che tutti si accompagnano ad un'alterazione del pool venoso.
Nello shock cardiogeno il primo meccanismo è invece un deficit di riempimento cardiaco.
L'emorragia è la causa più semplice d a comprendere come meccanismo, per questo eccesso di perdita di volume si ha l'incapacità di controllo del volume e quindi ci sono meccanismi di adattamento alla bassa perfusione, eccesso di vasocostrizione e ipossia che attivano l'endotelio.
Lo Shock ostruttivo può avere varia genesi, la più tipica è quella da ostacolo di ritorno venoso oppure ostacolo del riempimento delle camere cardiache ad esempio per versamento pericardico massivo e cioè una compressione elle camere cardiache che impedisce il riempimento. Anche il pneumotorace comprime determinando una pressione positiva, una pressione transmurale con valore negativo, la pressione esterna è maggiore di quella intravascolare quindi si ha un cattivo ritorno venoso. Un altro ostacolo è quello dato dall'embolia polmonare attraverso l'occlusione dell'arteria polmonare da trombo embolizzato.
Le conseguenze sono l'aumento delle pressioni del circolo a monte, caduta di pressione a valle, cattivo riempimento del ventricolo sinistro e bassa gittata sistolica. Tutte queste condizioni determinano un cambiamento del ritorno venoso e poi un basso riempimento arterioso e quindi ipoperfusione d'organo.
Lo shock maldistributivo è quello tipico della condizione anafilattica oppure dello shock neurogeno dato da trauma spinale e mancato controllo vasomotorio. Lo shock anafilattico è conseguente alla liberazione massiva di istamina, vasodilatazione.
Lo shock cardiogeno per esempio da l'infarto del miocardio oppure insufficienza cronica che porta alla fine a shock e morte . La funzionalità di pompa è così inefficiente nel mantenere la perfusione da avere sofferenza ipossica, malnutrizione e deficit multi organo . Lo shock settico è la condizione più comune anche perché passa attraverso vari step, raramente è fulminante, la maggior parte delle volte è uno stato compensato che può durare molto tempo. Questo shock si manifesta con una risposta flogistica da parte dell'organismo , una vasodilatazione non solo ossido nitrico, caduta della pressione di perfusione, attivazione delle cellule infiammatorie, espressione di Tf e cid.
Questo shock passa per passaggi comuni e l'aspetto emodinamico è solo successivo a quelli flogistici.

Riguardo all'esame il professore spiega come si parta dalla comprensione generale del problema per poi scendere nel dettaglio (ndr).